

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
27 mars 2003 (27.03.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 03/025163 A2**

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> : C12N 9/00

(74) Mandataire : RINUY, Santarelli: BP 237, 14, avenue de  
la Grande Armée, F-75822 Paris Cedex 17 (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR02/03120

(22) Date de dépôt international :

12 septembre 2002 (12.09.2002)

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

01/11911 14 septembre 2001 (14.09.2001) FR

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) : IN-  
STITUT PASTEUR [FR/FR]; 28, rue du Docteur Roux,  
F-75015 Paris (FR). TAILLIEZ, Patrick [FR/FR]; 22bis, rue  
Fénelon - Le Val d'Albion, F-91400 Saclay (FR). MAR-  
LIERE, Philippe [FR/FR]; 2, Allée Saint-Martin, F-91450  
Etiolles (FR). QUENEE, Pascal [FR/FR]; 1, allée du Bois  
de Nogent, F-78310 Maurepas (FR). COTAYA, Rachel  
[FR/FR]; 3, rue Jeanne d'Arc, F-75013 Paris (FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,  
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,  
MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,  
SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,  
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,  
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet  
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet  
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,  
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), brevet  
OAPI (BF, BJ, CI, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,  
MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : KAMIN-  
SKI, Pierre-Alexandre [FR/FR]; 4, rue Bailly, F-75003  
Paris (FR). TAILLIEZ, Patrick [FR/FR]; 22bis, rue  
Fénelon - Le Val d'Albion, F-91400 Saclay (FR). MAR-  
LIERE, Philippe [FR/FR]; 2, Allée Saint-Martin, F-91450  
Etiolles (FR). QUENEE, Pascal [FR/FR]; 1, allée du Bois  
de Nogent, F-78310 Maurepas (FR). COTAYA, Rachel  
[FR/FR]; 3, rue Jeanne d'Arc, F-75013 Paris (FR).

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée  
dès réception de ce rapport

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.

(54) Title: LACTOBACILLUS N-DEOXYRIBOSYL TRANSFERASES, CORRESPONDING NUCLEOTIDE SEQUENCES  
AND THEIR USES

(54) Titre: N-DESOXYRIBOSYLTRANSFERASES DE LACTOBACILLES, SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES CORRESPON-  
DANTES ET LEURS APPLICATIONS

(57) Abstract: The invention concerns novel polypeptides and their fragments, isolated from Lactobacillus, having at least a N-de-  
oxyribosyl transferase activity, the polynucleotides encoding said polypeptides, cloning and/or expression vectors including said  
polynucleotides, cells transformed by said vectors and specific antibodies directed against said polypeptides. The invention also  
concerns a method for enzymatic synthesis of deoxyribonucleosides.

(57) Abrégé : La présente invention concerne de nouveaux polypeptides et leurs fragments, isolés de Lactobacillus, ayant au moins  
une activité N-désoxyribosyltransférase, les polynucléotides, les polynucléotides codant et/ou d'expression incluant lesdits vecteurs  
et les anticorps spécifiques dirigés contre lesdits polypeptides. L'invention concerne également un procédé de synthèse enzymatique  
de désoxyribonucléosides.

WO 03/025163 A2

**"N-DESOXYRIBOSYLTRANSFERASES DE LACTOBACILLES, SEQUENCES  
NUCLEOTIDIQUES CORRESPONDANTES ET LEURS APPLICATIONS"**

La présente invention est relative au domaine de la  
biologie, et plus particulièrement de la production  
microbiologique d'analogues de bases. La présente  
5 invention concerne de nouveaux polypeptides et leurs  
fragments, isolés de *Lactobacillus*, ayant au moins une  
activité N-désoxyribosyltransférase, les polynucléotides  
codant lesdits polypeptides, les vecteurs de clonage  
et/ou d'expression incluant lesdits polynucléotides, les  
10 cellules transformées par lesdits vecteurs et les  
anticorps spécifiques dirigés contre lesdits  
polypeptides. L'invention concerne également un procédé  
de synthèse enzymatique de désoxyribonucléosides.

Les analogues de nucléosides dont la structure  
15 comporte des altérations du sucre ou de la base  
hétérocyclique, forment une famille de molécules actives  
dans le traitement de nombreuses infections  
bactériennes, virales, parasitaires et fongiques ainsi  
que dans la chimiothérapie antitumorale [Périgaud et  
20 coll, 1992]. Par ailleurs les propriétés insecticides et  
herbicides de certains antibiotiques nucléosidiques en  
font des agents potentiels dans le secteur de  
l'agrochimie et de l'environnement [Isono, 1988].  
L'industrie emploie deux modes de production de ces  
25 analogues, la synthèse organique et la conversion  
biocatalytique (conversion enzymatique et conversion  
microbiologique), qui présentent avantages et  
inconvénients opposés. La synthèse organique permet  
d'accéder aux structures chimiques les plus variées mais

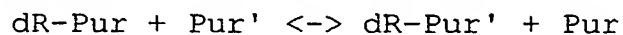
nécessite des étapes multiples et coûteuses en réactifs et en solvants. Au contraire, les méthodes biocatalytiques permettent une production aisée en milieu aqueux mais limitée à un petit nombre de composés possibles du fait de la spécificité des enzymes, qui admettent une gamme limitée d'analogues à la place de leurs substrats physiologiques. Les nucléosides phosphorylases et N-désoxyribosyltransférase, qui proviennent des voies de sauvegarde des purines et pyrimidines chez les bactéries, sont les enzymes les plus utilisées pour ces conversions enzymatiques (Krenisky et coll, 1981).

Il existe donc une nécessité urgente d'obtenir des enzymes de conversion de nucléosides et de leurs dérivés, ayant une activité enzymatique élargie afin de diversifier la production industrielle de ces composés. C'est le problème technique que se propose de résoudre les inventeurs de la présente invention.

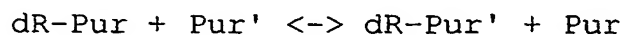
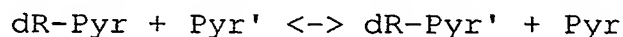
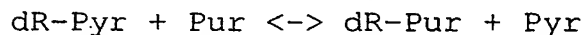
La N-désoxyribosyltransférase de *Lactobacillus leichmannii* ainsi que celle de *L. helveticus*, partiellement purifiée ou non, se révèle être le meilleur donneur de groupement glycosyl et tolère un nombre important de variations structurales sur la base. Cette enzyme a été utilisée pour produire un certain nombre d'analogues parmi lesquels il convient de citer la 2-chloro,2'-désoxyadénosine (Carson et coll, 1984), les 2',3'-didésoxynucléosides des bases naturelles (Carson et Wasson, 1988) ou encore plusieurs pyrazolo(3,4-d)pyrimidine et triazolo(4,5-d)pyrimidine dérivés de la 2',3'-didésoxycytidine et de la base correspondante (Fischer et coll, 1990).

Dans le but de disposer d'enzymes recombinantes capables de traiter la plus large variété de substrats déviants soit par la base ou par le sucre, les inventeurs ont isolé des gènes codant pour une activité  
5 N-désoxyribosyltransférase de différentes souches de lactobacilles. Cette variété d'enzymes N-désoxyribosyltransférase permet d'augmenter les chances d'obtenir des enzymes à la spécificité élargie par des mutations dans les gènes sauvages ou par des chimères de  
10 ces gènes sauvages.

Deux classes de N-désoxyribosyltransférase ont été distinguées (Danzin et Cardinaud, 1976), la première (classe I) désigné ptd (pour purine transdésoxyribosylase) catalysant exclusivement  
15 l'échange de désoxyribose entre deux purines:



et la deuxième (classe II) désignés ntd (pour nucléoside transdésoxyribosylase), l'échange de désoxyribose entre une purine et une pyrimidine, entre  
20 deux pyrimidines ou entre deux purines:



Seuls deux gènes spécifiant des enzymes de classe  
25 II, désignés ntd, ont été rapportés à ce jour (Hück, 1997 ; dbj|BAA92683.2| (AB039914)).

La présente invention a donc pour objet un polypeptide isolé ou purifié de *Lactobacillus* ayant au moins une activité N-désoxyribosyltransférase de séquence  
30 d'acides aminés choisi parmi les séquences SEQ ID N°2, SEQ ID N°4, SEQ ID N°6, SEQ ID N°8, SEQ ID N°10, SEQ ID N°12, SEQ ID N°14.

Selon un mode préféré de réalisation, le polypeptide selon l'invention est la N-désoxyribosyltransférase de SEQ ID N°2 (ou SEQ ID N°14) codée par le gène ntd Lh de *Lactobacillus helveticus*.

5 Selon un second mode préféré de réalisation, le polypeptide selon l'invention est la N-désoxyribosyltransférase de SEQ ID N°4 codée par le gène ptd Lh de *Lactobacillus helveticus*.

10 Selon un troisième mode préféré de réalisation, le polypeptide selon l'invention est la N-désoxyribosyltransférase de SEQ ID N°6 codée par le gène ntd Lf de *Lactobacillus fermentum*.

15 Selon un quatrième mode préféré de réalisation, le polypeptide selon l'invention est la N-désoxyribosyltransférase de SEQ ID N°8 codée par le gène ntd de *Lactobacillus crispatus*.

20 Selon un cinquième mode préféré de réalisation, le polypeptide selon l'invention est la N-désoxyribosyltransférase de SEQ ID N°10 codée par le gène ntd de *Lactobacillus amylovorus*.

Selon un sixième mode préféré de réalisation, le polypeptide selon l'invention est la N-désoxyribosyltransférase de SEQ ID N°12 codée par le gène ntd de *Lactobacillus acidophilus*.

25 Le polypeptide isolé selon l'invention se caractérise en ce qu'il comprend un polypeptide choisi parmi (a) un polypeptide de séquence SEQ ID N°2, SEQ ID N°4, SEQ ID N°6, SEQ ID N°8, SEQ ID N°10, SEQ ID N°12, SEQ ID N°14; (b) un polypeptide variant de polypeptide  
30 de séquences d'acides aminés défini en a) ; (c) un polypeptide homologue au polypeptide défini en (a) ou (b) et comportant au moins 80 % d'identité, de

préférence 85 %, 87 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 %  
d'identité avec ledit polypeptide de a) ; (d) un  
fragment d'au moins 15 acides aminés consécutifs de  
préférence 17, 20, 23, 25, 30, 40, 50, 100, 250 amino-  
5 acides consécutifs d'un polypeptide défini en a), b) ou  
c) ; et (e) un fragment biologiquement actif d'un  
polypeptide défini en a), b) ou c).

Le polypeptide selon l'invention se caractérise en  
ce qu'il permet de satisfaire l'exigence en guanine de  
10 certaines souches bactériennes telles PAK6 qui est une  
souche d'*E. coli* dont les deux gènes de l'opéron *guaBA*,  
qui commandent la conversion de IMP en XMP puis en GMP,  
ainsi que ceux de l'opéron *deoCABD* qui commandent la  
dégradation des désoxynucléosides, ont été délétés. En  
15 effet, ces souches pour survivre ou croître nécessitent  
l'apport de désoxyguanosine (dR-G) dans le milieu de  
culture et la présence d'une activité N-  
désoxyribosyltransférase d'un polypeptide selon  
l'invention pour réaliser l'échange:  $dR-G + A \leftrightarrow dR-A +$   
20 G.

Dans la présente description, on utilisera le  
terme polypeptide pour désigner également une protéine  
ou un peptide.

On entendra par polypeptide variant l'ensemble des  
25 polypeptides mutés pouvant exister naturellement, en  
particulier chez l'être humain, et qui correspondent  
notamment à des troncatures, substitutions, délétions  
et/ou additions de résidus d'acides-amino.

Par polypeptide homologue, on entendra désigner les  
30 polypeptides présentant, par rapport aux  
désoxyribosyltransférases naturelles de *Lactobacillus*  
selon l'invention, certaines modifications comme en

particulier une délétion, addition ou substitution d'au moins un acide aminé, une troncature, un allongement et/ou une fusion chimérique. Parmi les polypeptides homologues, on préfère ceux dont la séquence d'acides aminés présente au moins 80% d'identité, de préférence d'au moins 85%, 87%, 90%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99% d'identité avec les séquences d'acides aminés des polypeptides selon l'invention. Dans le cas d'une substitution, un ou plusieurs acides aminés consécutifs ou non consécutifs, peuvent être remplacés par des acides aminés « équivalents ». L'expression acide aminé « équivalent » vise ici à désigner tout acide aminé susceptible d'être substitué à l'un des acides aminés de la structure de base sans cependant modifier les caractéristiques ou propriétés fonctionnelles essentielles, comme leurs activités biologiques (c'est-à-dire de désoxyribosyltransférase), des polypeptides correspondants telles que l'induction *in vivo* d'anticorps capables de reconnaître le polypeptide dont la séquence d'acides aminés est comprise dans la séquence d'acides aminés SEQ ID N°2, SEQ ID N°4, SEQ ID N°6, SEQ ID N°8, SEQ ID N°10, SEQ ID N°12, SEQ ID N°14, ou l'un de ses fragments. Ces acides aminés équivalents peuvent être déterminés soit en s'appuyant sur leur homologie de structure avec les acides aminés auxquels ils se substituent, soit sur les résultats des essais d'activité biologique croisée auxquels les différents polypeptides sont susceptibles de donner lieu. A titre d'exemple, on mentionnera les possibilités de substitutions susceptibles d'être effectuées sans qu'il en résulte une modification approfondie des activités biologiques des polypeptides modifiés correspondants,

les remplacements, par exemple, de la leucine par la valine ou l'isoleucine, de l'acide aspartique par l'acide glutamique, de la glutamine par l'asparagine, de l'arginine par la lysine etc., les substitutions  
5 inverses étant naturellement envisageables dans les mêmes conditions.

Par fragment de polypeptide, on entend désigner un polypeptide comportant au minimum 15 acides aminés consécutifs, de préférence 17, 20, 23, 25, 30, 40, 50,  
10 100, 250 amino-acides consécutifs. Les fragments de polypeptide selon l'invention obtenus par clivage dudit polypeptide par une enzyme protéolytique, par un réactif chimique, ou encore en plaçant ledit polypeptide dans un environnement très acide font également partie de  
15 l'invention.

Par fragment biologiquement actif, on entendra désigner en particulier un fragment de séquence d'acides aminés de polypeptide selon l'invention présentant au moins une des caractéristiques ou propriétés  
20 fonctionnelles du polypeptide selon l'invention, notamment en ce qu'il comporte une activité N-désoxyribosyltransférase. Le polypeptide variant, le polypeptide homologue ou le fragment de polypeptide selon l'invention possède au moins 10%, de préférence  
25 20% , 30 , 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% de l'activité N-désoxyribosyltransférase.

Différents protocoles connus de l'homme de l'art ont été décrits pour introduire des mutations dans les polypeptides. Parmi ceux-ci il convient de citer à titre  
30 d'exemple la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) en présence de manganèse (Cadwell et al., 1992). Les mutations peuvent être introduites soit de manière



aléatoire - dans ce cas l'étape de mutagenèse est suivie d'une étape de criblage du mutant d'intérêt - soit de manière ciblée. Dans ce dernier cas, les mutations sont de préférence introduites au niveau du site catalytique  
5 des N-désoxyribosyltransférases selon l'invention.

De préférence un polypeptide selon l'invention est un polypeptide constitué de la séquence SEQ ID N°2, SEQ ID N°4, SEQ ID N°6, SEQ ID N°8, SEQ ID N°10, SEQ ID N°12, SEQ ID N°14 ou d'une séquence possédant au moins  
10 80% d'identité, de préférence au moins 85%, 90%, 95%, 98% et 99% d'identité avec la SEQ ID N°2, SEQ ID N°4, SEQ ID N°6, SEQ ID N°8, SEQ ID N°10, SEQ ID N°12, SEQ ID N°14 après alignement optimal. Par polypeptide dont la séquence d'acides aminés présentant un pourcentage  
15 d'identité d'au moins 80%, de préférence d'au moins 85%, 90%, 95%, 98% et 99% après alignement optimal avec une séquence de référence, on entend désigner les polypeptides présentant certaines modifications par rapport au polypeptide de référence, comme en  
20 particulier une ou plusieurs délétions, troncations, un allongement, une fusion chimérique, et/ou une ou plusieurs substitutions.

Parmi les polypeptides dont la séquence d'acides aminés présente un pourcentage d'identité d'au moins  
25 80%, de préférence d'au moins 85%, 90%, 95%, 98% et 99% après alignement optimal avec les séquences SEQ ID N° 2, SEQ ID N°4, SEQ ID N°6, SEQ ID N°8, SEQ ID N°10, SEQ ID N°12, SEQ ID N°14 ou avec l'un de leurs fragments selon l'invention, on préfère les polypeptides variants codés  
30 par les séquences peptidiques variantes telles que précédemment définies, en particulier les polypeptides dont la séquence d'acides aminés présente au moins une

mutation correspondant notamment à une troncation, délétion, substitution et/ou addition d'au moins un résidu d'acide aminé par rapport aux séquences SEQ ID N°2, SEQ ID N°4, SEQ ID N°6, SEQ ID N°8, SEQ ID N°10, 5 SEQ ID N°12, SEQ ID N°14 ou avec l'un de leurs fragments ; de manière plus préférée, les polypeptides variants présentant au moins une mutation qui diminue la spécificité du polypeptide selon l'invention pour son substrat, de sorte que les polypeptides variants selon 10 l'invention sont capables de catalyser une plus large variété de substrat, afin d'obtenir une gamme plus étendue d'analogues de base.

L'invention concerne également un polynucléotide purifié ou isolé caractérisé en ce qu'il code pour un 15 polypeptide tel que défini précédemment, et de préférence pour un polypeptide de séquence SEQ ID N°2, SEQ ID N°4, SEQ ID N°6, SEQ ID N°8, SEQ ID N°10, SEQ ID N°12, SEQ ID N°14. De manière préférée, le polynucléotide selon l'invention possède la séquence SEQ 20 ID N°1, SEQ ID N°3, SEQ ID N°5, SEQ ID N°7, SEQ ID N°9, SEQ ID N°11, SEQ ID N°13.

Le polynucléotide isolé ou purifié selon l'invention se caractérise en ce qu'il comprend un polynucléotide choisi parmi (a) SEQ ID N°1, SEQ ID N°3, 25 SEQ ID N°5, SEQ ID N°7, SEQ ID N°9, SEQ ID N°11, SEQ ID N°13 ; (b) la séquence d'un fragment d'au moins 15 nucléotides consécutifs, de préférence d'au moins 18, 21, 24, 27, 30, 35, 40, 50, 75, 100, 150, 200 nucléotides consécutifs de la séquence SEQ ID N°1, SEQ 30 ID N°3, SEQ ID N°5, SEQ ID N°7, SEQ ID N°9, SEQ ID N°11, SEQ ID N°13; (c) une séquence nucléique présentant un pourcentage d'identité d'au moins 70 %, de préférence

d'au moins 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% et 99% après alignement optimal avec une séquence définie en a) ou b); (d) la séquence complémentaire ou la séquence d'ARN correspondant à une séquence telle que définie en a), b) ou c).

Le polynucléotide selon l'invention se caractérise également en ce que son expression dans les cellules hôtes, notamment les souches bactériennes telles PAK6, permet de satisfaire à l'exigence en guanine de la dite souche. La souche PAK6 a été déposée à la CNCM le 2 mai 2001 sous le N° I-2664. La souche PAK6 correspond à la souche bactérienne d'*Escherichia coli* MG 1655 délétée de deux gènes guaA et guaB ainsi que des gènes déoC, déoA, déoB, déoD. La souche PAK6 ( $\Delta$ guaBA::gm  $\Delta$ deo-11) est auxotrophe pour la guanine en milieu minimal glucose.

Par acide nucléique, séquence nucléique ou d'acide nucléique, polynucléotide, oligonucléotide, séquence de polynucléotide, séquence nucléotidique, termes qui seront employés indifféremment dans la présente description, on entend désigner un enchaînement précis de nucléotides, modifiés ou non, permettant de définir un fragment ou une région d'un acide nucléique, comportant ou non des nucléotides non naturels, et pouvant correspondre aussi bien à un ADN double brin, un ADN simple brin que des produits de transcription desdits ADN, et/ou un fragment d'ARN.

Il doit être compris que la présente invention ne concerne pas les séquences nucléotidiques dans leur environnement chromosomique naturel, c'est-à-dire à l'état naturel. Il s'agit de séquences qui ont été isolées et/ou purifiées, c'est-à-dire qu'elles ont été prélevées directement ou indirectement, par exemple par

copie, leur environnement ayant été au moins partiellement modifié. On entend ainsi également désigner les acides nucléiques obtenus par synthèse chimique.

5 Par polynucléotide de séquence complémentaire, on entend désigner tout ADN dont les nucléotides sont complémentaires de ceux de la SEQ ID N°1, SEQ ID N°3, SEQ ID N°5, SEQ ID N°7, SEQ ID N°9, SEQ ID N°11, SEQ ID N°13 ou d'une partie de la SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ  
10 ID N° 5, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 11, SEQ ID N°13 et dont l'orientation est inversée.

Par « pourcentage d'identité » entre deux séquences d'acides nucléiques ou d'acides aminés au sens de la présente invention, on entend désigner un pourcentage de  
15 nucléotides ou de résidus d'acides aminés identiques entre les deux séquences à comparer, obtenu après le meilleur alignement, ce pourcentage étant purement statistique et les différences entre les deux séquences étant réparties au hasard et sur toute leur longueur. On  
20 entend désigner par "meilleur alignement" ou "alignement significatif", l'alignement pour lequel le pourcentage d'identité déterminé comme ci-après est le plus élevé. Les comparaisons de séquences entre deux séquences d'acides nucléiques ou d'acides aminés sont  
25 traditionnellement réalisées en comparant ces séquences après les avoir alignées de manière significative, ladite comparaison étant réalisée par segment ou par « fenêtre de comparaison » pour identifier et comparer les régions locales de similarité de séquence.  
30 L'alignement significatif des séquences pour la comparaison peut être réalisé, outre manuellement, au moyen de l'algorithme d'homologie locale de Smith et

Waterman (1981), au moyen de l'algorithme d'homologie locale de Needleman et Wunsch (1970), au moyen de la méthode de recherche de similarité de Pearson et Lipman (1988), au moyen de logiciels informatiques utilisant  
5 ces algorithmes (GAP, BESTFIT, BLAST P, BLAST N, FASTA et TFASTA dans le Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI). Afin d'obtenir l'alignement significatif, on utilise de préférence le programme BLAST, avec la matrice BLOSUM  
10 62. On peut également utiliser les matrices PAM ou PAM250.

Le pourcentage d'identité entre deux séquences d'acides nucléiques ou d'acides aminés est déterminé en comparant ces deux séquences alignées de manière  
15 significative, la séquence d'acides nucléiques ou d'acides aminés à comparer pouvant comprendre des additions ou des délétions par rapport à la séquence de référence pour un alignement significatif entre ces deux séquences. Le pourcentage d'identité est calculé en  
20 déterminant le nombre de positions identiques pour lesquelles le nucléotide ou le résidu d'acide aminé est identique entre les deux séquences, en divisant ce nombre de positions identiques par le nombre total de positions comparées et en multipliant le résultat obtenu  
25 par 100 pour obtenir le pourcentage d'identité entre ces deux séquences.

Par séquences nucléiques présentant un pourcentage d'identité d'au moins 70%, de préférence d'au moins 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% et 99% après alignement  
30 significatif avec une séquence de référence, on entend désigner les séquences nucléiques présentant, par rapport à la séquence nucléique de référence, certaines

modifications comme en particulier une délétion, une troncation, un allongement, une fusion chimérique, et/ou une substitution, notamment ponctuelle, et dont la séquence nucléique présente au moins 70%, de préférence

5 au moins 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% et 99% d'identité après alignement significatif avec la séquence nucléique de référence. Il s'agit de préférence de séquences dont les séquences complémentaires sont susceptibles de s'hybrider spécifiquement avec les séquences SEQ ID N°1,

10 SEQ ID N°3, SEQ ID N°5, SEQ ID N°7, SEQ ID N°9, SEQ ID N°11, SEQ ID N°13 de l'invention. De préférence, les conditions d'hybridation spécifiques ou de forte stringence seront telles qu'elles assurent au moins 70%, de préférence d'au moins 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% et

15 99% d'identité après alignement significatif entre l'une des deux séquences et la séquence complémentaire de l'autre. Une hybridation dans des conditions de forte stringence signifie que les conditions de température et de force ionique sont choisies de telle manière qu'elles

20 permettent le maintien de l'hybridation entre deux fragments d'ADN complémentaires. A titre illustratif, des conditions de forte stringence de l'étape d'hybridation aux fins de définir les fragments polynucléotidiques décrits ci-dessus, sont

25 avantageusement les suivantes : l'hybridation ADN-ADN ou ADN-ARN est réalisée en deux étapes : (1) préhybridation à 42°C pendant 3 heures en tampon phosphate (20 mM, pH 7,5) contenant 5 x SSC (1 x SSC correspond à une solution 0,15 M NaCl + 0,015 M citrate de sodium), 50 %

30 de formamide, 7 % de sodium dodécyl sulfate (SDS), 10 x Denhardt's, 5 % de dextran sulfate et 1% d'ADN de sperme de saumon ; (2) hybridation proprement dite pendant 20

heures à une température dépendant de la taille de la sonde (c'est-à-dire : 42°C, pour une sonde de taille > 100 nucléotides) suivie de 2 lavages de 20 minutes à 20°C en 2 x SSC + 2 % SDS, 1 lavage de 20 minutes à 20°C  
5 en 0,1 x SSC + 0,1 % SDS. Le dernier lavage est pratiqué en 0,1 x SSC + 0,1 % SDS pendant 30 minutes à 60°C pour une sonde de taille > 100 nucléotides. Les conditions d'hybridation de forte stringence décrites ci-dessus  
10 adaptées par l'homme du métier pour des oligonucléotides de taille plus grande ou plus petite, selon l'enseignement de Sambrook et al., 1989.

Parmi les séquences nucléiques présentant un pourcentage d'identité d'au moins 70 %, de préférence  
15 d'au moins 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% et 99% après alignement significatif avec la séquence selon l'invention, on préfère également les séquences nucléiques variantes de SEQ ID N°1, SEQ ID N°3, SEQ ID N°5, SEQ ID N°7, SEQ ID N°9, SEQ ID N°11, SEQ ID N°13,  
20 ou de leurs fragments, c'est-à-dire l'ensemble des séquences nucléiques correspondant à des variants alléliques, c'est-à-dire des variations individuelles des séquences SEQ ID N°1, SEQ ID N°3, SEQ ID N°5, SEQ ID N°7, SEQ ID N°9, SEQ ID N°11, SEQ ID N°13.

25 Plus particulièrement, l'invention concerne un acide nucléique purifié ou isolé selon la présente invention, caractérisé en ce qu'il comprend ou est constitué de l'une des séquences SEQ ID N°1, SEQ ID N°3, SEQ ID N°5, SEQ ID N°7, SEQ ID N°9, SEQ ID N°11, SEQ ID  
30 N°13 de leurs séquences complémentaires ou des séquences de l'ARN correspondant à SEQ ID N° 1, SEQ ID N°3, SEQ ID N°5, SEQ ID N°7, SEQ ID N°9, SEQ ID N°11, SEQ ID N°13.

Les amorces ou sondes, caractérisées en ce qu'elles comprennent une séquence d'un acide nucléique selon l'invention, font également partie de l'invention. Ainsi, les amorces ou les sondes selon l'invention sont  
5 utiles pour la détection, l'identification, le dosage ou l'amplification de séquence d'acide nucléique. En particulier, ils peuvent permettre de mettre en évidence ou de discriminer les séquences nucléiques variantes, ou d'identifier la séquence génomique de nouveaux gènes  
10 eucaryotes ou procaryotes, bactériens notamment, et plus précisément de bactéries *Lactobacillus*, codant pour une N-désoxyribosyltransférase, en utilisant notamment une méthode d'amplification telle que la méthode PCR, ou une méthode apparentée. Selon l'invention, les  
15 polynucléotides pouvant être utilisés comme sonde ou comme amorce dans des procédés de détection, d'identification, de dosage ou d'amplification de séquence nucléique, présentent une taille minimale de 10 bases, de préférence d'au moins 15, 18, 20, 25, 30, 40,  
20 50 bases. Selon un mode de réalisation, les amorces selon l'invention sont choisies parmi les séquences SEQ ID N° 15 et SEQ ID N° 16.

Les polynucléotides selon l'invention peuvent ainsi être utilisés comme amorce et/ou sonde dans des procédés  
25 mettant en œuvre notamment la technique de PCR (amplification en chaîne par polymérase) (Rolfs et al., 1991). Cette technique nécessite le choix de paires d'amorces oligonucléotidiques encadrant le fragment qui doit être amplifié. On peut, par exemple, se référer à  
30 la technique décrite dans le brevet américain U.S. N° 4 683 202. Les fragments amplifiés peuvent être identifiés, par exemple après une électrophorèse en gel



d'agarose ou de polyacrylamide, ou après une technique chromatographique comme la filtration sur gel ou la chromatographie échangeuse d'ions, puis séquencés. La spécificité de l'amplification peut être contrôlée en  
5 utilisant comme amorces les séquences nucléotidiques de polynucléotides de l'invention et comme matrices, des plasmides contenant ces séquences ou encore les produits d'amplification dérivés. Les fragments nucléotidiques amplifiés peuvent être utilisés comme réactifs dans des  
10 réactions d'hybridation afin de mettre en évidence la présence, dans un échantillon biologique, d'un acide nucléique cible de séquence complémentaire à celle desdits fragments nucléotidiques amplifiés. L'invention vise également les acides nucléiques susceptibles d'être  
15 obtenus par amplification à l'aide d'amorces selon l'invention.

D'autres techniques d'amplification de l'acide nucléique cible peuvent être avantageusement employées comme alternative à la PCR (PCR-like) à l'aide de couple  
20 d'amorces de séquences nucléotidiques selon l'invention. Par PCR-like on entend désigner toutes les méthodes mettant en œuvre des reproductions directes ou indirectes des séquences d'acides nucléiques, ou bien dans lesquelles les systèmes de marquage ont été  
25 amplifiés, ces techniques sont bien entendu connues. En général il s'agit de l'amplification de l'ADN par une polymérase ; lorsque l'échantillon d'origine est un ARN il convient préalablement d'effectuer une transcription reverse. Il existe actuellement de très nombreux  
30 procédés permettant cette amplification, comme par exemple la technique SDA (Strand Displacement Amplification) ou technique d'amplification à

déplacement de brin (Walker et al., 1992), la technique TAS (Transcription-based Amplification System) décrite par Kwoh et al. (1989), la technique 3SR (Self-Sustained Sequence Replication) décrite par Guatelli et al. (1990), la technique NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification) décrite par Kievitis et al. (1991), la technique TMA (Transcription Mediated Amplification), la technique LCR (Ligase Chain Reaction) décrite par Landegren et al. (1988), la technique de RCR (Repair Chain Reaction) décrite par Segev (1992), la technique CPR (Cycling Probe Reaction) décrite par Duck et al. (1990), la technique d'amplification à la Q- $\beta$ -réplicase décrite par Miele et al. (1983). Certaines de ces techniques ont depuis été perfectionnées.

Dans le cas où le polynucléotide cible à détecter est un ARNm, on utilise avantageusement, préalablement à la mise en œuvre d'une réaction d'amplification à l'aide des amorces selon l'invention ou à la mise en œuvre d'un procédé de détection à l'aide des sondes de l'invention, une enzyme de type transcriptase inverse afin d'obtenir un ADNc à partir de l'ARNm contenu dans l'échantillon biologique. L'ADNc obtenu servira alors de cible pour les amorces ou les sondes mises en œuvre dans le procédé d'amplification ou de détection selon l'invention.

La technique d'hybridation de sondes peut être réalisée de manières diverses (Matthews et al., 1988). La méthode la plus générale consiste à immobiliser l'acide nucléique extrait des cellules de différents tissus ou de cellules en culture sur un support (tels que la nitrocellulose, le nylon, le polystyrène) pour réaliser par exemple des puces à ADN, puis à incuber, dans des conditions bien définies, l'acide nucléique

cible immobilisé avec la sonde. Après l'hybridation, l'excès de sonde est éliminé et les molécules hybrides formées sont détectées par la méthode appropriée (mesure de la radioactivité, de la fluorescence ou de l'activité enzymatique liée à la sonde).

Selon un autre mode de mise en œuvre des sondes nucléiques selon l'invention, ces dernières peuvent être utilisées comme sondes de capture. Dans ce cas, une sonde, dite « sonde de capture », est immobilisée sur un support et sert à capturer par hybridation spécifique l'acide nucléique cible obtenu à partir de l'échantillon biologique à tester et l'acide nucléique cible est ensuite détecté grâce à une seconde sonde, dite « sonde de détection », marquée par un élément facilement détectable.

Parmi les fragments d'acides nucléiques intéressants, il convient par ailleurs de citer en particulier les oligonucléotides anti-sens, c'est-à-dire dont la structure assure, par hybridation avec la séquence cible, une inhibition de l'expression du produit correspondant. Il faut également citer les oligonucléotides sens qui, par interaction avec des protéines impliquées dans la régulation de l'expression du produit correspondant, induiront soit une inhibition, soit une activation de cette expression. Les oligonucléotides selon l'invention présente une taille minimale de 9 bases, de préférence d'au moins 10, 12, 15, 17, 20, 25, 30, 40, 50 bases.

Les sondes, amorces et oligonucléotides selon l'invention peuvent être marqués directement ou indirectement par un composé radioactif ou non radioactif, par des méthodes bien connues de l'homme du

métier, afin d'obtenir un signal détectable et/ou quantifiable. Les séquences de polynucléotides selon l'invention non marquées peuvent être utilisées directement comme sonde ou amorce.

5 Les séquences sont généralement marquées pour obtenir des séquences utilisables pour de nombreuses applications. Le marquage des amorces ou des sondes selon l'invention est réalisé par des éléments radioactifs ou par des molécules non radioactives. Parmi  
10 les isotopes radioactifs utilisés, on peut citer le  $^{32}\text{P}$ , le  $^{33}\text{P}$ , le  $^{35}\text{S}$ , le  $^3\text{H}$  ou le  $^{125}\text{I}$ . Les entités non radioactives sont sélectionnées parmi les ligands tels la biotine, l'avidine, la streptavidine, la dioxygénine, les haptènes, les colorants, les agents luminescents  
15 tels que les agents radioluminescents, chémoluminescents, bioluminescents, fluorescents, phosphorescents.

L'invention comprend également une méthode de détection et/ou de dosage d'un polynucléotide selon  
20 l'invention, dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comporte les étapes suivantes : (i) d'isolement de l'ADN à partir de l'échantillon biologique à analyser, ou obtention d'un ADNc à partir de l'ARN de l'échantillon biologique ; (ii)  
25 d'amplification spécifique de l'ADN codant pour le polypeptide selon l'invention à l'aide d'amorces ; (iii) d'analyse des produits d'amplification. C'est également un objet de l'invention de fournir une trousse pour la détection et/ou le dosage d'un acide nucléique selon  
30 l'invention, dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend les éléments suivants : (i) un couple d'amorces nucléiques selon l'invention, (ii) les

réactifs nécessaires pour effectuer une réaction d'amplification d'ADN, et éventuellement (iii) un composant permettant de vérifier la séquence du fragment amplifié, plus particulièrement une sonde selon l'invention.

L'invention comprend aussi une méthode de détection et/ou de dosage d'acide nucléique selon l'invention, dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comporte les étapes suivantes : (i) de mise en contact d'un polynucléotide selon l'invention avec un échantillon biologique ; (ii) de détection et/ou de dosage de l'hybride formé entre ledit polynucléotide et l'acide nucléique de l'échantillon biologique. C'est également un objet de l'invention de fournir une trousse pour la détection et/ou le dosage d'acide nucléique selon l'invention, dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend les éléments suivants : (i) une sonde selon l'invention, (ii) les réactifs nécessaires à la mise en œuvre d'une réaction d'hybridation, et/ou le cas échéant, (iii) un couple d'amorces selon l'invention, ainsi que les réactifs nécessaires à une réaction d'amplification de l'ADN.

De préférence, l'échantillon biologique selon l'invention dans lequel sont réalisés la détection et le dosage est constitué par un milieu de culture, un broyat cellulaire, un fluide corporel, par exemple un sérum humain ou animal, du sang, du lait.

La présente invention concerne également les vecteurs recombinants de clonage et/ou d'expression comprenant un polynucléotide selon l'invention et/ou exprimant un polypeptide selon l'invention. Une telle cellule hôte est également un objet de l'invention.

De préférence, les vecteur recombinants selon l'invention sont :

- le vecteur appelé pLH2 comprenant le polynucléotide SEQ ID N°1 tel que présent dans la souche bactérienne déposée à la CNCM le 30 mai 2001 sous le N°I-2676 ; le plasmide pLH2 contient un fragment Alu I de 1,4 kb contenant le gène codant pour la N-désoxyribosyltransférase de type II de *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 cloné dans le site SmaI du plasmide pBAM3 ; le plasmide pLH2, qui exprime cette enzyme, est propagé dans la souche PAK6 auxotrophe pour la guanine ;
- le vecteur appelé pLH4 comprenant le polynucléotide SEQ ID N°3 tel que présent dans la souche bactérienne déposée à la CNCM le 30 mai 2001 sous le N°I-2677 ; le plasmide pLH4 contient un fragment AluI de 1,6 kb contenant le gène codant pour la N-désoxyribosyltransférase de type I de *Lactobacillus helveticus* CNRZ32, cloné dans le site SmaI du plasmide pBAM3. Le plasmide pLH4, qui exprime cette enzyme, est propagé dans la souche PAK6 auxotrophe pour la guanine ;
- le vecteur appelé pLF6 comprenant le polynucléotide SEQ ID N°5 tel que présent dans la souche bactérienne déposée à la CNCM le 30 mai 2001 sous le N°I-2678 ; le plasmide pLF6 contient un fragment AluI de 1,36 kb contenant le gène codant pour la N-désoxyribosyltransférase de type II de *Lactobacillus fermentum* CIP102780T. Le plasmide pLF6, qui exprime cette enzyme est propagé dans la souche PAK6 auxotrophe pour la guanine ;

- le vecteur appelé pLA comprenant le polynucléotide SEQ ID N°11 tel que présent dans la souche bactérienne déposée à la CNCM le 21 juin 2001 sous le N° I-2689 ; le plasmide pLA correspond au plasmide pSU19 est cloné aux sites PstI et BamHI un insert contenant le gène codant pour la N-désoxyribosyltransférase de type II de *Lactobacillus acidophilus* CNRZ 1296. Le plasmide est propagé dans la souche d'*Escherichia coli* TG-I.
- 10 Les vecteurs selon l'invention comportent les éléments nécessaires à l'expression, et notamment, de préférence un promoteur, des signaux d'initiation et de terminaison de la traduction, ainsi que des régions appropriées de régulation de la transcription. Ils
- 15 doivent pouvoir être maintenus de façon stable dans la cellule et peuvent éventuellement posséder des signaux particuliers spécifiant la sécrétion de la protéine traduite.

Les différents signaux de contrôle sont choisis en fonction de l'hôte cellulaire utilisé. A cet effet, les séquences d'acide nucléique selon l'invention peuvent être insérées dans des vecteurs à réplication autonome au sein de l'hôte choisi, ou des vecteurs intégratifs de l'hôte choisi. Parmi les systèmes à réplication

20 autonome, on utilise de préférence en fonction de la cellule hôte, des systèmes de type « plasmide », « cosmide », « phagemide » ou « mini-chromosome », ou des systèmes de type viral, les vecteurs viraux pouvant notamment être des adénovirus

25 (Perricaudet et al., 1992), des rétrovirus, des lentivirus, des poxvirus ou des virus herpétiques (Epstein et al., 1992). L'homme du métier connaît les

30

technologies utilisables pour chacun de ces systèmes. Lorsque l'on souhaite l'intégration de la séquence dans les chromosomes de la cellule hôte, on peut utiliser par exemple des systèmes de type plasmidique ou viral ; de  
5 tels virus sont, par exemple, les rétrovirus (Temin, 1986), ou les AAV (Carter, 1993).

Parmi les vecteurs non viraux, on préfère les polynucléotides nus tels que l'ADN nu ou l'ARN nu selon la technique développée par la société VICAL, les  
10 chromosomes artificiels de bactérie (BAC, "bacterial artificial chromosome"), les chromosomes artificiels de levure (YAC, "yeast artificial chromosome") pour l'expression dans la levure, les chromosomes artificiels de souris (MAC, "mouse artificial chromosome") pour  
15 l'expression dans les cellules murines et de manière préférée les chromosomes artificiels d'homme (HAC, "human artificial chromosome") pour l'expression dans les cellules humaines.

De tels vecteurs sont préparés selon les méthodes  
20 couramment utilisées par l'homme du métier, et les clones en résultant peuvent être introduits dans un hôte approprié par des méthodes standard, telles que par exemple la lipofection, l'électroporation, le choc thermique, la transformation après perméabilisation  
25 chimique de la membrane, la fusion cellulaire.

L'invention comprend en outre les cellules hôtes, notamment les cellules eucaryotes et procaryotes, transformées par les vecteurs selon l'invention. Parmi les cellules utilisables aux sens de la présente  
30 invention, on peut citer les bactéries et les levures. Selon un mode de réalisation préférée de l'invention, la bactérie est choisie parmi le groupe composé de



*Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus acidophilus*,  
*Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus crispatus*,  
*Lactobacillus helveticum*, *Lactobacillus lactis*,  
*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Campylobacter*  
5 *pylori*, *Helicobacter pylori*, *Agrobacterium tumefaciens*,  
*Staphylococcus aureus*, *Thermophilus aquaticus*,  
*Azorhizobium caulinodans*, *Rhizobium leguminosarum*,  
*Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitis*. Selon un  
mode préféré de réalisation de l'invention, la bactérie  
10 est *Lactobacillus*. Selon un mode préféré, il s'agit  
de :

- la bactérie transformée par le plasmide pLH2  
comprenant le polynucléotide SEQ ID N°1 telle que  
déposée à la CNCM le 30 mai 2001 sous le N°I-2676 ;
- 15 - la bactérie transformée par le plasmide pLH4  
comprenant le polynucléotide SEQ ID N°3 telle que  
déposée à la CNCM le 30 mai 2001 sous le N°I-2677 ;
- la bactérie transformée par le plasmide pLF6  
comprenant le polynucléotide SEQ ID N°5 telle que  
20 déposée à la CNCM le 30 mai 2001 sous le N°I-2678 ;
- la bactérie transformée par le plasmide pLA  
comprenant le polynucléotide SEQ ID N°11 telle que  
déposée à la CNCM le 21 juin sous le N°I-2689.

Selon un autre mode préféré de réalisation la  
25 bactérie est *Escherichia coli*. Selon un autre mode de  
réalisation de l'invention, la cellule est une levure  
qui est de préférence *Saccharomyces cerevisiae*,  
*Saccharomyces pombe*, *Candida albicans*.

Parmi les cellules hôte selon l'invention, il  
30 convient également de citer les cellules d'insectes, les  
cellules animales ou végétales.

De préférence, la cellule selon l'invention est dépourvue d'activité enzymatique susceptible de dégrader ledit désoxyribonucléoside précurseur ou ledit désoxyribonucléoside obtenu par réaction bioenzymatique catalysée par un polypeptide selon l'invention. Alternativement, ladite cellule hôte peut être pourvue d'activités bio-enzymatiques additionnelles destinées à transformer le désoxyribonucléoside précurseur, et/ou le désoxyribonucléoside obtenu par la réaction bioenzymatique catalysée par le polypeptide selon l'invention. Parmi ces activités bio-enzymatiques additionnelles, il convient de citer la phosphorylation, la sulfatation, l'acétylation, la succinylation, la méthylation.

La séquence d'acide nucléique codant pour les N-désoxyribosyltransférases selon l'invention est soit naturellement présente dans ladite cellule soit est introduite dans ladite cellule par les techniques de l'ADN recombinant connues de l'homme du métier. Selon un mode préféré de réalisation, la séquence d'acide nucléique introduite dans ladite cellule par les techniques de l'ADN recombinant et qui code pour une N-désoxyribosyltransférase selon l'invention est hétérologue. On entend désigner par séquence d'acide nucléique hétérologue, une séquence d'acide nucléique qui n'est pas présente naturellement dans la cellule selon l'invention.

La présente invention concerne également les organismes métazoaires, végétaux ou animaux, de préférence les mammifères, excepté l'Homme, comprenant une desdites cellules transformées selon l'invention. Parmi les animaux selon l'invention, on préfère les

rongeurs, en particulier les souris, les rats ou les lapins, exprimant au moins un polypeptide selon l'invention.

Les cellules de préférence bactériennes, ou  
5 fongiques notamment de levure, ainsi que les organismes métazoaires selon l'invention sont utilisables dans une méthode de production de N-désoxyribosyltransférase selon l'invention. La méthode de production d'un polypeptide de l'invention sous forme recombinante,  
10 elle-même comprise dans la présente invention, se caractérise en ce que l'on cultive les cellules transformées, notamment les cellules de la présente invention, dans des conditions permettant l'expression et éventuellement la sécrétion d'un polypeptide  
15 recombinant codé par une séquence d'acide nucléique selon l'invention, et que l'on récupère ledit polypeptide recombinant. Les polypeptides recombinants susceptibles d'être obtenus par cette méthode de production font également partie de l'invention. Ils  
20 peuvent se présenter sous forme glycosylée ou non glycosylée et peuvent présenter ou non la structure tertiaire de la protéine naturelle. Les séquences des polypeptides recombinants peuvent être également modifiées afin d'améliorer leur solubilité, en  
25 particulier dans les solvants aqueux. De telles modifications sont connues de l'homme du métier comme par exemple la délétion de domaines hydrophobes ou la substitution d'acides aminés hydrophobes par des acides aminés hydrophiles.

30 Ces polypeptides peuvent être produits à partir des séquences d'acide nucléique définies ci-dessus, selon les techniques de production de polypeptides

recombinants connues de l'homme du métier. Dans ce cas, la séquence d'acide nucléique utilisée est placée sous le contrôle de signaux permettant son expression dans un hôte cellulaire.

5        Un système efficace de production d'un polypeptide recombinant nécessite de disposer d'un vecteur et d'une cellule hôte selon l'invention. Ces cellules peuvent être obtenues par l'introduction dans des cellules hôtes d'une séquence nucléotidique insérée dans un vecteur tel  
10 que défini ci-dessus, puis la mise en culture desdites cellules dans des conditions permettant la répllication et/ou l'expression de la séquence nucléotidique transfectée.

Les procédés utilisés pour la purification d'un  
15 polypeptide recombinant sont connus de l'homme du métier. Le polypeptide recombinant peut être purifié à partir de lysats et extraits cellulaires, du surnageant du milieu de culture, par des méthodes utilisées individuellement ou en combinaison, tels que le  
20 fractionnement, les méthodes de chromatographie, les techniques d'immunoaffinité à l'aide d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux spécifiques, etc. Une variante préférée consiste à produire un polypeptide recombinant fusionné à une protéine « porteuse »  
25 (protéine chimère). L'avantage de ce système est qu'il permet une stabilisation et une diminution de la protéolyse du produit recombinant, une augmentation de la solubilité au cours de la renaturation *in vitro* et/ou une simplification de la purification lorsque le  
30 partenaire de fusion possède une affinité pour un ligand spécifique.

Les polypeptides selon la présente invention peuvent aussi être obtenus par synthèse chimique en utilisant l'une des nombreuses synthèses peptidiques connues, par exemple les techniques mettant en œuvre des phases solides ou des techniques utilisant des phases solides partielles, par condensation de fragments ou par une synthèse en solution classique. Les polypeptides obtenus par synthèse chimique et pouvant comporter des acides aminés non naturels correspondants sont également  
10 compris dans l'invention.

Les polypeptides selon l'invention permettent de préparer des anticorps monoclonaux ou polyclonaux. C'est donc également un des objets de la présente invention de fournir un anticorps monoclonal ou polyclonal et ses  
15 fragments, caractérisés en ce qu'ils lient sélectivement et/ou spécifiquement un polypeptide selon l'invention. Les anticorps chimériques, les anticorps humanisés et les anticorps simple chaîne font également partie de l'invention. Les fragments d'anticorps selon l'invention  
20 sont de préférence des fragments Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fc ou Fv. Les anticorps polyclonaux pourront être préparés, par exemple par immunisation d'un animal, en particulier une souris, avec un polypeptide selon l'invention associé à un adjuvant de la réponse immunitaire, puis purification  
25 des anticorps spécifiques contenus dans le sérum des animaux immunisés sur une colonne d'affinité sur laquelle a préalablement été fixé le polypeptide ayant servi d'antigène. Les anticorps polyclonaux selon l'invention peuvent aussi être préparés par purification  
30 sur une colonne d'affinité, sur laquelle a préalablement été immobilisé un polypeptide selon l'invention. Les anticorps monoclonaux pourront avantageusement être

préparés à partir d'hybridomes selon la technique décrite par Kohler et Milstein en 1975.

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, l'anticorps est capable d'inhiber  
5 l'interaction entre la N-désoxyribosyltransférase de l'invention et son substrat afin d'altérer la fonction physiologique dudit polypeptide N-désoxyribosyltransférase.

L'invention concerne également des méthodes pour la  
10 détection et/ou la purification d'un polypeptide selon l'invention, caractérisées en ce qu'elles mettent en œuvre un anticorps selon l'invention. L'invention comprend en outre des polypeptides purifiés, caractérisés en ce qu'ils sont obtenus par une méthode  
15 selon l'invention.

Par ailleurs, outre leur utilisation pour la purification des polypeptides, les anticorps de l'invention, en particulier les anticorps monoclonaux, peuvent également être utilisés pour la détection de ces  
20 polypeptides dans un échantillon biologique.

Pour ces différentes utilisations, les anticorps de l'invention pourront également être marqués de la même manière que décrit précédemment pour les sondes nucléiques de l'invention et de manière préférée avec un  
25 marquage de type enzymatique, fluorescent ou radioactif.

Les anticorps de l'invention constituent également un moyen d'analyse de l'expression de polypeptide selon l'invention, par exemple par immunofluorescence, marquage à l'or, immunoconjugués enzymatiques. Plus  
30 généralement, les anticorps de l'invention peuvent être avantageusement mis en œuvre dans toute situation où l'expression d'un polypeptide selon l'invention, normal

ou muté, doit être observée, et plus particulièrement en immunocytochimie, en immunohistochimie ou dans des expériences de « western blotting ». Ainsi, un procédé de détection d'un polypeptide selon l'invention dans un échantillon biologique, comprenant les étapes de mise en contact de l'échantillon biologique avec un anticorps selon l'invention et de mise en évidence du complexe antigène-anticorps formé est également un objet de l'invention.

10 C'est également un des objets de la présente invention de fournir un procédé de synthèse enzymatique *in vitro* ou *in vivo* de désoxyribonucléotides caractérisé en ce qu'il comprend au moins une étape réactionnelle catalysée par au moins une N-désoxyribosyltransférase  
15 selon l'invention. Le procédé selon l'invention se caractérise en ce que la dite N-désoxyribosyltransférase catalyse l'échange d'une première nucléobase présente dans un désoxyribonucléoside par une seconde nucléobase.

20 Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, la dite seconde nucléobase est sélectionnée dans le groupe composé des purines liées par N9, des pyrimidines liées par N1, des azines liées par N1, des imidazoles liées par N1, lesdites secondes nucléobases  
25 pouvant porter des substitutions des hydrogènes aux positions non liées. De préférence, ladite seconde nucléobase est sélectionnée dans le groupe composé de la 6-méthyl purine, 2-amino-6-méthylmercaptopurine, 6-diméthylaminopurine, 5-azacytidine, 2,6-dichloropurine,  
30 6-chloroguanine, 6-chloropurine, 6-aza-thymine, 5-fluoro-uracile, éthyl-4-amino-5-imidazole carboxylate, imidazole-4-carboxamide et 1,2,4-triazole-3-carboxamide.

La dite première nucléobase est quant à elle, sélectionnée de préférence dans le groupe composé de l'adénine, la guanine, la thymine, l'uracile et l'hypoxanthine. Ces listes ne sont pas exhaustives, et  
5 il est évident que des analogues naturels ou non-naturels de nucléobases peuvent être employés dans la présente invention comme substrat d'une N-désoxyribosyl transférase de l'invention.

Facultativement, le procédé *in vivo* selon  
10 l'invention se caractérise en ce qu'il comprend en outre l'étape d'introduire dans la cellule hôte la première nucléobase présente dans un désoxyribonucléoside.

Facultativement, le procédé *in vivo* selon l'invention se caractérise en ce qu'il comprend en outre  
15 l'étape d'introduire dans la cellule hôte la seconde nucléobase présente dans un désoxyribonucléoside.

Facultativement, le procédé *in vivo* selon l'invention se caractérise en ce qu'il comprend en outre l'étape d'introduire dans la cellule hôte la première  
20 nucléobase présente dans un désoxyribonucléoside et la seconde nucléobase de manière simultanée et/ou décalée dans le temps.

Les désoxyribonucléosides susceptibles d'être produit en grande quantité et de manière peu onéreuse  
25 par la méthode de biosynthèse selon l'invention constituent donc des composés d'intérêt destinés au traitement préventif ou curatif de pathologies humaines ou animales, tumorales, virales telles que le SIDA (syndrome d'immunodéficience humaine acquise),  
30 bactériennes, parasitaires ou fongiques. Alternativement, ces désoxyribonucléosides susceptibles d'être produit en grande quantité et de manière peu



onéreuse par la méthode de biosynthèse selon l'invention  
constituent des herbicides et des insecticides.

La présente invention fournit également un procédé  
de criblage nutritionnel destiné à isoler des  
5 désoxyribosyltransférases, de préférence les  
polypeptides selon l'invention mais également leurs  
homologues ou leurs mutants. Ce premier crible selon  
l'invention comprend les étapes :

(i) (facultativement) obtention d'une souche  
10 bactérienne, telle *Escherichia coli*,  
auxotrophe en guanine. De préférence cette  
souche est incapable de pousser en présence de  
désoxyguanosine comme source de guanine. De  
manière préférée, il s'agit de la souche PAK  
15 6.

(ii) transfert d'ADN exogène, de préférence sous la  
forme d'un vecteur d'expression, dans la  
bactérie, l'ADN exogène étant susceptible de  
comprendre une séquence codant pour une  
20 désoxyribosyltransférase.

(iii) culture des bactéries obtenues à l'étape (ii)  
sur un milieu contenant de la désoxyguanosine.

(iv) isolement de l'ADN exogène transféré dans les  
bactéries de l'étape (iii) qui se sont  
25 développées sur le milieu contenant de la  
désoxyguanosine.

La présente invention fournit également un crible  
nutritionnel pour distinguer les activités  
désoxyribosyltransférases I et II, de préférence  
30 notamment pour distinguer entre les polypeptides ntd et  
ptd selon l'invention. Ce second crible comprend les  
étapes de :

- (i) obtention d'une souche bactérienne telle par exemple *Escherichia coli*, auxotrophe pour la guanine et la thymidine. De préférence cette souche est incapable de pousser en présence de guanine et de thymidine. De manière préférée, il s'agit de la souche PAK 26 ( $\Delta$  guaBguaA :: Adeo-11  $\Delta$ thyA :: erm  $\Delta$ (udp-metE)zif9 :: Tn10) est auxotrophe pour la méthionine, la guanine et la thymidine).
- (ii) transfert de l'ADN exogène, de préférence sous la forme d'un vecteur d'expression dans la bactérie, l'ADN exogène étant susceptible de comprendre une séquence codant pour une désoxyribosyltransférase I ou II.
- (iii) culture des bactéries obtenues à l'étape (ii) sur un milieu contenant de la désoxyguanosine puis détermination si les bactéries poussent ou non. Si les bactéries poussent, alors l'ADN exogène code pour une activité désoxyribosyltransférase II qui s'exprime dans la dite bactérie. Si les bactéries ne poussent pas, alors l'ADN exogène est susceptible de coder pour une activité désoxyribosyltransférase I.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaissent dans la suite de la description avec les exemples représentés ci-après.

## EXEMPLES

### 1. MATERIEL ET METHODES

#### 5      1.1. Souches et conditions de culture :

Les souches de bactéries lactiques utilisées proviennent de la collection CNRZ (Centre National de Recherche Zootechnique), Unité de Recherches Laitières et Génétique Appliquée, INRA, Jouy en Josas. Elles sont  
10 cultivées en bouillon MRS (de Man et coll., J. Appl. Bacteriol., 23 :130-135, 1960) et incubées à 30°C, 37°C ou 42°C selon les espèces. La souche d'Escherichia coli TG1, fournie par Stratagène, est cultivée dans du LB (Luria broth base 10g/L, Agar-agar 16g/L) sous agitation  
15 et à 37°C.

#### 1.2. Préparation de l'ADN cellulaire total des bactéries lactiques :

Les cultures en fin de phase exponentielle sont  
20 centrifugées pendant 5 minutes à 13000 g. Le culot correspondant à une culture de 2 ml est repris dans 200 µl de TES (Tris 50 mM, pH8, EDTA 10 mM, pH8, saccharose 250 mM) contenant 20 µg/ml de lysozyme et 50 U/ml de mutanolysine (Sigma). Après une incubation d'une  
25 heure à 37°C, la clarification de la préparation est obtenue en ajoutant 60 µl de SDS 20%.

L'extraction des acides nucléiques est effectuée en ajoutant au lysat 500 µl de phénol saturé en eau, pH8, additionné d'hydroxyquinoline 0.1% et 100 µl d'un  
30 mélange de chloroforme-alcool isoamylique (24/1, V/V). La solution est homogénéisée puis centrifugée 10 minutes à 13000 g et à température ambiante. La phase

supérieure, limpide et contenant les acides nucléiques est gardée. Sur cette dernière, l'extraction est répétée trois fois afin d'éliminer les constituants cellulaires indésirables. Les traces de phénol sont éliminées en  
5 ajoutant 500 µl de chloroforme-alcool isoamylique à la phase aqueuse. Après homogénéisation et centrifugation pendant 3 minutes à 15000 g et à 4°C, les acides nucléiques contenus dans la phase aqueuse supérieure sont précipités par addition d'un volume d'isopropanol  
10 froid. Après une incubation d'une heure à -20°C, une centrifugation est effectuée pendant 20 minutes à 15000 g et à 4°C. L'isopropanol est éliminé et remplacé par 500 µl d'éthanol 70%. Une dernière centrifugation de 10 minutes à 15000 g et à 4°C permet de récupérer un culot  
15 d'acides nucléiques. Celui-ci est mis à sécher dans un évaporateur et remis en suspension dans 200 µl d'eau stérile contenant 10 µl d'ARNase à 10 µg/µl. Après 15 minutes d'incubation à 37°C pour faire agir l'enzyme dégradant les ARN, 10 µl de la solution d'ADN sont mis à  
20 migrer par électrophorèse dans un gel d'agarose 0.8% afin d'en évaluer la concentration et la qualité.

### 1.3. Réaction de polymérisation en chaîne de l'ADN

#### (PCR) :

25 Les réactions de polymérisation en chaîne (PCR) sont effectuées dans un volume réactionnel de 100 µl contenant 20 à 100 ng d'ADN, 0,5 µM d'amorces, 200 µM des dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), dans un tampon Tris-HCl pH 9 à 10 mM, KCl à 50 mM, MgCl<sub>2</sub> à 1,5 mM, BSA à  
30 0,002% ainsi que 2,5 unités de la polymérase Taq. Trente cycles d'amplification ont été appliqués (Gene Amp PCR

systems 2400, Perkin Elmer). Les inventeurs ont défini deux amorces ntd 1 (SEQ ID N° 15) et ntd2 (SEQ ID N° 16) à partir de la séquence ntd de *Lactobacillus leichmanii* décrite par Huck (communication personnelle) :

5

|       |                               |          |          |
|-------|-------------------------------|----------|----------|
| ntd 1 | 5'-AGA CGA TCT ACT TCG GTG-3' | 18 bases | Tm= 54°C |
| ntd 2 | 5'-ACG GCA CCT TCG TAG AAG-3' | 18 bases | Tm= 56°C |

#### 1.4. Hybridation de type Southern :

**Restriction enzymatique des ADN.** Les ADN totaux sont digérés par une ou plusieurs enzymes de restriction. Les enzymes utilisées sont : BamHI, BglII, ClaI, EcoRI, HindIII, HpaI, NcoI, NotI, PstI, XbaI, XhoI (Bio-Lab). La digestion est réalisée dans un volume final de 40 µl contenant 70 U d'enzyme, 4 µl de tampon NEB (Bio-Lab) 10X et 4 à 8 µg d'ADN. L'incubation s'effectue pendant 1h30 à 37°C.

**Transfert de l'ADN sur une membrane.** Les fragments d'ADN totaux issus de la digestion enzymatique sont séparés à l'aide d'un gel d'agarose à 0,7%. Après migration, le gel d'agarose est placé sous agitation dans une solution de dépurination (HCl 0.25N) pendant 30 minutes. Ce procédé permet ainsi le transfert des fragments d'ADN supérieur à 10 kbs. Après rinçage à l'eau, l'ADN est dénaturé en plaçant le gel pendant 40 minutes dans une solution de NaCl 5M, NaOH 0,5M. Le gel est rincé à l'eau puis incubé de nouveau 30 minutes dans une solution de neutralisation, NaCl 1,5M, Tris HCl 0,5M; pH 7,5. Les ADN sont transférés par capillarité sur une membrane de nylon chargée positivement (Hybond N+, Amersham). Ils sont élués par un flux ascendant de

SSC 20X (citrate trisodique 0,3M ; NaCl 3M ; pH7). Après le transfert, les ADN sont fixés de manière covalente sur la membrane à l'aide d'un appareil UV Stratalinker 2400 (Stratagene).

5

**Préparation de la sonde.** La sonde utilisée est un fragment interne du gène *ntd* de *Lactobacillus helveticus* amplifié par PCR. La sonde est purifiée à l'aide du kit Wizard (Promega) afin d'éliminer les amorces PCR. La concentration de sonde nécessaire est de 10 ng/ $\mu$ l. Le marquage de l'ADN est réalisé en utilisant le kit de marquage ECL (Amersham). Pour ce faire, l'ADN est dénaturé par chauffage 5 minutes à 100°C et immédiatement refroidi dans la glace. Un volume de réactif de marquage (peroxydase) puis un volume de solution de glutaraldéhyde sont additionnés. Cette solution est incubée pendant 10 minutes à 37°C pour fixer de manière covalente la peroxydase à l'ADN.

**Hybridation et révélation.** Après une préhybridation d'une heure à 42°C dans du tampon d'hybridation, la membrane est hybridée pendant 16h à 42°C en présence de la sonde marquée. Afin d'éliminer la sonde fixée de manière non spécifique, la membrane est lavée pendant 20 minutes à 42°C dans deux bains successifs de tampon: urée 6M - SDS 0,4% - SSC 0,5X, puis rincée pendant 5 minutes dans deux bains successifs de tampon: citrate de sodium 0,3M - NaCl 3M pH 7. La révélation est effectuée par autoradiographie selon le protocole du kit ECL. Un premier réactif de révélation contenant du peroxyde d'hydrogène est réduit par la peroxydase fixée sur la sonde. Puis le luminol contenu dans un deuxième réactif

de révélation est alors oxydé, produisant de la lumière qui impressionne le film autoradiographique.

### 1.5. Clonage de fragments PCR :

5 Les gènes homologues à ntd amplifiés par PCR sont insérés dans le plasmide vecteur pBluescript II SK+ d'E. coli TG1 (Stratagene). Ce plasmide est auparavant restreint en son site unique par l'enzyme EcoRV (Gibco-BRL) qui crée des extrémités franches. Le mélange de  
10 digestion est effectué dans un volume de 30 µl, contenant 4 µl d'ADN. Les fragments des ADN amplifiés à cloner doivent avoir leurs extrémités 5' et 3' franches afin de permettre le clonage. La préparation des extrémités franches de 50 µl de produits PCR purifiés à  
15 l'aide du kit Wizard (Promega) est réalisée dans un volume réactionnel de 100 µl contenant 3,6 unités d'ADN polymérase du phage T4 (Bio-Lab) et 6 unités d'ADN polymérase I (ou fragment de Klenow) (Bio-Lab), n'ayant pas d'activité exonucléasique 5' > 3'. La polymérisation  
20 se fait pendant 20 minutes à 11°C puis les enzymes sont inactivées après 10 minutes à 75°C. L'ADN est ensuite précipité en présence de deux volumes d'éthanol 100%, de glycogène et de 10 % d'acétate de sodium 3M, pH 4,8. Le mélange est placé pendant une heure à -20°C puis  
25 centrifugé 20 minutes à 15000 g. Le culot est rincé avec 250 µl d'éthanol à 70 %, centrifugé à nouveau 10 minutes à 15000 g, séché dans un évaporateur et remis en suspension dans 20 µl d'eau stérile.

30 L'ADN restreint du plasmide pBS-SK+ et le fragment amplifié sont mis à co-migrer sur un gel d'agarose à

0,7 % afin d'évaluer leurs concentrations respectives : le nombre de molécules du fragment à cloner doit être trois à quatre fois supérieur à celui du plasmide. La ligation se fait dans un volume de 10 µl contenant 60 ng d'insert, 26 ng de plasmide pBS-SK+ restreint, 2 unités de ligase (T4 DNA ligase, Boehringer-Mannheim), pendant la nuit à 16°C. Les produits de ligation sont dialysés sur un filtre Milipore 0,025 µm de manière à enlever les sels et à éviter ainsi les arcs électriques lors de l'électroporation.

#### 1.6. Transformation :

*Préparation des cellules électro-compétentes de la souche TG1 d'E. coli.* A partir de 5 ml d'une culture de nuit à 37°C sous agitation, 500 ml de milieu LB sont inoculés. La culture est placée sous agitation à 37°C jusqu'à atteindre une D.O.<sub>600nm</sub> = 1. Elle est ensuite refroidie pendant 2 heures dans la glace puis centrifugée pendant 10 minutes à froid à 5000 rpm. Le surnageant est éliminé, le culot est repris dans 400 ml d'eau froide. Cette préparation est centrifugée pendant 10 minutes à froid et à 5000 trs/mn. Le culot obtenu est de nouveau repris dans 250 ml d'eau froide. A la suite d'une centrifugation de 10 minutes, le culot est repris dans 25 ml d'eau froide puis les cellules sont remises en suspension dans un volume final de 1ml de glycérol 10%, et réparties en aliquot avant d'être congelées rapidement dans l'azote liquide.

*Transformation par électroporation et sélection des clones.* Les cellules électro-compétentes conservées à -80°C sont décongelées dans la glace puis mises en



contact avec 5 µl de mélange de ligation dans une cuvette d'électroporation. Le Gene-Pulser (Bio-Rad) est réglé à 200 Volts, 25 mF, 250 Ohms. Les cellules sont ensuite soumises à l'électroporation. On ajoute 1ml  
5 d'une solution de SOC (bactopeptone 20g/L, yeast extract 5g/L, NaCl 5M 2ml/L, KCl 1M 2.5 ml/L, MgCl<sub>2</sub> 1M 10ml/L, MgSO<sub>4</sub> 1M 10ml/L), contenant 0.4% de glucose à la suspension cellulaire qui est mise à incuber à 37°C pendant une heure. Les cellules sont ensuite étalées sur  
10 un milieu sélectif LB -Xgal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galatoside à 1µg/mL) -IPTG (isopropylthio-β-D-galactoside, 1µg/ml) -Ampicilline (50 µg/ml), et incubées à 37°C pendant la nuit.

15       **Extraction rapide d'ADN plasmidique des clones de *E. coli* recombinants par lyse alcaline.** Les cellules de *E. coli* transformées et cultivées en milieu LB contenant de l'ampicilline (100 µg/ml) sont récoltées par centrifugation à 15000 g pendant 10 minutes à 4°C. Elles  
20 sont resuspendues dans 100 µl d'une solution Saccharose 50 mM, Tris-HCl 25mM, pH 8, EDTA 10 mM, pH 8. La lyse alcaline et la dénaturation de l'ADN se fait par ajout de 200 µl de NaOH 0.2N, SDS 1%. L'ensemble est laissé 1 minute à température ambiante après avoir ajouté 200 µl  
25 de chloroforme. Puis, 150 µl d'une solution d'acétate de potassium 5M, acide acétique glacial sont additionnés. L'ensemble est centrifugé pendant 15 min à 13000 g à 4°C. La phase aqueuse contenant l'ADN est précipitée en présence de 2 volumes d'éthanol 100% puis centrifugée  
30 pendant 20 minutes à 13000 g à 4°C. Le culot est lavé à l'éthanol 70%, centrifugé 10 minutes à 13000 g puis

remis en suspension dans 30 µl d'eau stérile contenant de l'ARNase à 10 ng/ml.

### 1.7. PCR inverse :

5        La PCR inverse permet d'amplifier les régions flanquant un fragment d'ADN de séquence connue. Cette technique se déroule en trois étapes :

*Digestion de la matrice d'ADN.* La matrice d'ADN est  
10 digérée par une ou deux enzymes de restriction choisies de telle sorte qu'elles ne coupent pas dans la séquence connue du gène et qu'elles permettent d'obtenir un fragment de taille adaptée (1 à 3 kb). Afin de choisir une enzyme adaptée, l'ADN total est digéré séparément  
15 par plusieurs enzymes. Puis des hybridations de type Southern sont réalisées en utilisant comme sonde le fragment d'ADN de séquence connue. Les digestions pour lesquelles la sonde hybride avec un fragment de taille de 1 à 3 kb, sont utilisées pour la PCR inverse. Les  
20 fragments d'ADN obtenus par digestion sont circularisés. Pour cela, 100 unités de T4 ADN ligase et 100 µl de tampon de ligation sont ajoutés à 4 à 8 µg d'ADN dans un volume final de 1ml. Le mélange de ligation est mis à incuber à 15°C pendant la nuit. L'ADN ligaturé est  
25 ensuite précipité avec 100 µl d'acétate de sodium 3M, pH 4.8, 700 µl d'isopropanol et 2 µl de glycogène puis centrifugé pendant 30 minutes à 13000 g, à 4°C. Le culot est rincé dans 300 µl d'éthanol 70% et centrifugé 10 minutes à 13000 g, à 4°C. Le culot est repris dans 25 µl  
30 d'eau ultrapure.

**Amplification des ADN circularisés en utilisant des amorces divergentes.** Les réactions de polymérisation en chaîne sont effectuées dans un volume réactionnel de 100 µl contenant 20 à 100 ng d'ADN, 0,5 µM d'amorces, 5 200 µM des dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), dans un tampon Tris-HCl pH 9 à 10 mM, KCl à 50 mM, MgCl<sub>2</sub> à 1,5 mM BSA à 0,002% ainsi que 2,5 unités de la polymérase Taq.

L'amplification est effectuée dans les conditions  
10 suivantes :

|  |             |             |
|--|-------------|-------------|
| 94°C   | 3 minutes   | } 25 cycles |
| 94°C   | 30 secondes |             |
| 50 à 60°C (selon le T <sub>m</sub> des<br>amorces utilisées) | 1 minute    |             |
| 15 72°C  | 3 minutes   |             |

(Gene Amp PCR systems 2400, Perkin Elmer).

**Séquençage.** Les fragments PCR sont purifiés par le kit Wizard (Promega) afin d'éliminer les  
20 oligonucléotides non incorporés, les sels et la Taq polymérase. Le séquençage est réalisé à l'aide d'un séquenceur automatique 373A (Applied Biosystems-Perkin Elmer) en utilisant un kit ABI PRISM Dye Terminator (Perkin Elmer), basé sur l'incorporation de  
25 désoxynucléotides phosphate fluorescents lors de la phase d'élongation des amorces. Les réactions de séquences sont effectuées dans un volume réactionnel de 20 µl contenant 30 ng d'ADN, 4 µl de DyeT Mix (Perkin Elmer Biosystems) et 0.1mM d'amorce.

30

|         |      |             |             |
|---------|------|-------------|-------------|
| Cycle : |      |             |             |
| 5       | 96°C | 1 minute    | } 25 cycles |
|         | 96°C | 10 secondes |             |
|         | 50°C | 5 secondes  |             |
|         | 60°C | 4 minutes   |             |

A chaque réaction de séquence sont ajoutés 20 µl d'acétate de sodium 3M, pH 4.6, 50 µl d'éthanol à 95% et 1 µl de glycogène. La solution est laissée 15 minutes à température ambiante puis centrifugée 20 minutes à 13000 g. Le culot est ensuite rincé avec 250 µl d'éthanol 70% puis centrifugé pendant 10 minutes à 13000 g. Le culot est ensuite repris dans 6 µl de bleu de séquence (formamide 83%, EDTA 8.3mM, bleu dextran 2000000 (Sigma) 0.5%). Les échantillons sont dénaturés pendant 3 minutes à 90°C et 3 µl sont déposés sur gel d'acrylamide 4%.

2. UN CRIBLE NUTRITIONNEL UNIQUE POUR LES DEUX CLASSES DE N-DESOXYRIBOSYLTRANSFERASE CHEZ *ESCHERICHIA COLI*.

Un crible fonctionnel permettant de sélectionner la production de guanine a été établi chez *E. coli*, en délétant les deux gènes de l'opéron *guaBA* qui commande la conversion de IMP en XMP puis en GMP ainsi que ceux de l'opéron *deoCABD* qui commande la dégradation des désoxynucléosides, pour donner la souche PAK 6. Le génome d'*E. coli* spécifie une activité permettant de convertir la base G en GMP (guanine phosphoribosyltransférase codée par le gène *gpt*), ainsi qu'une activité permettant de libérer la base G du

désoxynucléoside dR-G (purine nucléoside phosphorylase codée par le gène *deoD*, dans l'opéron *deo*). La souche PAK 6 présente donc une exigence en guanine (G) qui ne pourra être satisfaite par l'apport de désoxyguanosine (dR-G). L'utilisation de désoxyguanosine (dR-G) pourra cependant être sélectionnée si une activité N-désoxyribosyltransférase s'exprime dans la souche PAK6, pour réaliser l'échange:  $dR-G + A \leftrightarrow dR-A + G$

Cet échange entre deux bases purines peut être catalysé par les deux classes d'enzyme. De fait, l'introduction du gène *ntd* de *L. leichmannii* dans la souche PAK 6 permet de satisfaire l'exigence en guanine à l'aide de désoxyguanosine (dR-G) et d'adénine (A).

### 3. CLONAGE FONCTIONNEL DU GENE PTD DE L. HELVETICUS.

Des fragments d'ADN de taille comprise entre 1 et 2kb obtenus par digestion partielle (*AluI*) de *L. helveticus* CNRZ 32 furent ligaturés dans un plasmide *ColE1* (de type pUC digéré par *SmaI* et déphosphorylé) et le mélange fut utilisé pour transformer la souche PAK6. Les clones transformants furent sélectionnés en milieu minéral glucose additionné de désoxyguanosine (dR-G) et d'adénine (A) à la concentration finale de 0,3mM.

L'un des clones transformants se révéla propager un plasmide contenant un insert commandant une activité N-désoxyribosyltransférase de classe I et déviant du profil de restriction du gène *ntd* de *L. helveticus*. La séquence de cet insert révéla un gène spécifiant un polypeptide de 167 acides aminés avec un poids moléculaire de 18790.70 Daltons présentant une

similarité de 28,6% avec le polypeptide NTD de *L. leichmanii*. La séquence de ce gène désigné ptd dévie de celle des gènes ntd rendant leur hybridation impossible (7,5% d'identité).

5 Incidemment, le gène ntd de *L. helveticus* commandant une activité N-désoxyribosyltransférase de classe II put être une nouvelle fois isolé parmi les clones transformants sélectionnés.

10 4. CLONAGE FONCTIONNEL DU GENE NTD DE *L. FERMENTUM*.

Les mêmes opérations de clonage et de sélection nutritionnelle furent effectuées à partir de l'ADN  
15 génomique de la souche *L. fermentum* CIP 102980T. Les clones transformants sélectionnés se révélèrent propager un plasmide dont les inserts présentant des profils de restriction semblables commandaient une activité N-désoxyribosyltransférase de classe II. La séquence d'un  
20 de ces inserts révéla un gène spécifiant un polypeptide de 168 acides aminés avec un poids moléculaire de 18878.20 Daltons présentant une similarité de 32,9% avec le polypeptide NTD de *L. leichmanii* et de 36,7% avec le polypeptide PTD de *L. helveticus*. La séquence de ce  
25 gène dévie de celle des gènes ntd et ptd rendant leur hybridation impossible. Le polypeptide NTD de *L. fermentum* présente une parenté évolutive plus marquée pour l'enzyme de classe I (PTD de *L. helveticus*) et une appartenance fonctionnelle à la classe II, suggérant une  
30 divergence évolutive précoce dans l'évolution de ces enzymes. Son activité enzymatique pourrait se montrer

différente de celles des autres espèces, et se prêter à la préparation d'un plus grand spectre de nucléosides.

#### 5. CLONAGE PAR PCR INVERSE DE QUATRE GENES NTD.

5 En utilisant des oligonucléotides dégénérés à partir de régions de la séquence en acides aminés du polypeptide NTD de *L. leichmannii* (Hück, 1997) un fragment interne au gène ntd de *L. helveticus* a été  
10 amplifié. A partir de ce fragment, des oligonucléotides ont été synthétisés de façon à obtenir la totalité du gène par PCR inverse.

A partir des deux séquences ntd de *L. leichmannii* et de *L. helveticus*, nous avons redéfini des amorces  
15 consensus pour isoler les gènes ntd d'autres espèces de lactobacilles comme *L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. amylovorus* avec la même démarche que celle décrite ci-dessus.

#### 20 6. Un crible nutritionnel pour distinguer les deux activités de désoxyribosyltransférases I et II.

Pour distinguer les deux activités désoxyribosyl transférase, l'ADN plasmidique de différentes colonies  
25 sélectionnées a été extrait puis utilisé pour transformer la souche PAK 26 auxotrophe pour la guanine et de la thymidine. Dans la souche PAK 26, le dTMP ne peut être synthétisé à partir du dUMP, parce que la thymidylate synthase codée par le gène thyA a été  
30 inactivé. De plus, la thymine ne peut être une source de thymidine parce que la thymidine phosphorylase codée par le gène deoA et l'uridine phosphorylase codée par le

gène *udp* ont été délétés. La Déoxyguanosine (dR-G) et la thymine (T) seront les sources de guanine et de thymidine, seulement si une activité N-désoxyribosyl transférase II est exprimée dans la souche PAK 26 pour  
5 catalyser la réaction d'échange  $dG + T \rightleftharpoons dT + G$ . Seules les colonies exprimant une activité N-désoxyribosyl transférase II peuvent pousser sur un milieu glucose minéral supplémenté en déoxyguanosine et en thymine comme sources de guanine et de thymidine. Ce second  
10 criblage a par exemple permis de corréler l'activité N-désoxyribosyltransférase II (*ntd*) avec le plasmide pLH2 comprenant le polynucléotide de SEQ ID N°1 et codant pour l'enzyme *ntd* de *Lactobacillus helveticus* et l'activité N-désoxyribosyltransférase I (*ptd*) avec le  
15 plasmide pLH4 comprenant le polynucléotide de SEQ ID N°3 et codant pour l'enzyme *ptd* de *Lactobacillus helveticus*.



**Tableau 1: Croissance de la souche PAK 6 exprimant ou non une activité N-désoxyribosyltransférase sur milieu mineral glucose (*in vivo*) et activité enzymatique des extraits bruts correspondants (*in vitro*)**

5

| <i>in vivo</i> |   |   |   |    |        | <i>in vitro</i> |        |        |
|----------------|---|---|---|----|--------|-----------------|--------|--------|
|                |   | A | G | dG | dG + A | dC + T          | dG + A | dC + A |
| PAK 6          | - | - | + | ±  | -      | -               | -      | -      |
| pSU19          |   |   |   |    |        |                 |        |        |
| PAK 6 ntd      | - | - | + | ±  | +      | +               | +      | +      |
| L1             |   |   |   |    |        |                 |        |        |
| PAK 6 ntd      | - | - | + | ±  | +      | +               | +      | +      |
| Lh             |   |   |   |    |        |                 |        |        |
| PAK 6 ptd      | - | - | + | ±  | +      | -               | +      | -      |
| Lh             |   |   |   |    |        |                 |        |        |
| PAK 6 ntd      | - | - | + | ±  | +      | +               | +      | +      |
| Lf             |   |   |   |    |        |                 |        |        |

(+) croissance

(-) absence de croissance

PAK 6: MG1655  $\Delta$ guaBA::Apra,  $\Delta$ deo

10 ntd L1: gène codant pour la N-désoxyribosyltransférase de *Lactobacillus leichmannii*

ntd Lh: gène codant pour la N-désoxyribosyltransférase de *Lactobacillus helveticus*

15 ntd Lf: gène codant pour la N-désoxyribosyltransférase de *Lactobacillus fermentum*

ptd Lh: gène codant pour la purine désoxyribosyltransférase de *Lactobacillus helveticus*

A: adénine; G: guanine; T: thymine; dG: désoxyguanosine;  
dC: désoxycytidine

REFERENCES

- Cadwell et al. (1992) *Research* 2 : 28-33.
- Carson & Wasson (1988) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **155**,  
5 829-834.
- Carson et al., (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 2232-2236.
- Carter (1993) *Curr. Op. Biotechnology* **3**, 533.
- Danzin & Cardinaud (1976) *Eur. J. Biochem.* **62**, 365-372.
- 10 Duck et al. (1990), *Biotechniques*, **9**, 142.
- Epstein (1992) *Médecine/Sciences*, **8**, 902.
- Fischer et al., (1990) *Ger. Offen. DE* 3840160.
- Guatelli et al. (1990), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:  
1874.
- 15 Isono (1988) *J. Antibiotics* **12**, 1711-1739.
- Kievitis et al., (1991) *J. Virol. Methods*, **35**, 273.
- Köhler et Milstein. (1975) *Nature* **256**, 495.
- Krenitsky et al., (1981) *Biochemistry* **20**, 3615-3621.
- Kwoh et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 1173.
- 20 Landegren et al. (1988) *Science* **241**, 1077.
- Matthews et al. (1988) *Anal. Biochem.*, **169**, 1-25.
- Miele et al., (1983) *J. Mol. Biol.*, **171**, 281-285.
- Neddleman et Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* **48** : 443
- Pearson et Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85** :  
25 2444
- Périgaud et al., (1992) *Annales de l'Institut Pasteur Actualités* **3**, 179-215.
- Perricaudet et al. (1992), *La Recherche* **23** : 471.
- Rolfs, A. et al. (1991), Berlin : Springer-Verlag.
- 30 Sambrook et al. (1989) *Molecular cloning : a laboratory manual second edition* - Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY. USA

Segev, (1992), Kessler C. Springer Verlag, Berlin, New-York, 197-205.

Smith et Waterman (1981) Ad. App. Math. 2 : 482

Temin, (1986) Retrovirus vectors for gene transfer. In

5 Kucherlapati R., ed. Gene Transfer.

Walker et al. (1992) EMBO J. 1 : 945-951

Wilson et al. (1995) Synthesis 1465-1479.

Wong C.H. et al. (1995) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 34, 412-432 et 521-546.

REVENDICATIONS

1. Polypeptide isolé ou purifié de *Lactobacillus*  
5 ayant au moins une activité N-désoxyribosyltransférase de  
séquence d'acides aminés choisi parmi les séquences SEQ  
ID N°2, SEQ ID N°4, SEQ ID N°6, SEQ ID N°8, SEQ ID N°10,  
SEQ ID N°12.
- 10 2. Polypeptide isolé selon la revendication 1  
caractérisé en ce que le polypeptide de SEQ ID N°2 est  
codé par la N-désoxyribosyltransférase codé par le gène  
ntd Lh de *Lactobacillus helveticus*.
- 15 3. Polypeptide isolé selon la revendication 1  
caractérisé en ce que le polypeptide de SEQ ID N°4 est  
codé par la N-désoxyribosyltransférase codé par le gène  
ptd Lh de *Lactobacillus helveticus*.
- 20 4. Polypeptide isolé selon la revendication 1  
caractérisé en ce que le polypeptide de SEQ ID N°6 est  
codé par la N-désoxyribosyltransférase codé par le gène  
ntd Lf de *Lactobacillus fermentum*.
- 25 5. Polypeptide isolé selon la revendication 1  
caractérisé en ce que le polypeptide de SEQ ID N°8 est  
codé par la N-désoxyribosyltransférase codé par le gène  
ntd de *Lactobacillus crispatus*.
- 30 6. Polypeptide isolé selon la revendication 1  
caractérisé en ce que le polypeptide de SEQ ID N°10 est

codé par la N-désoxyribosyltransférase codé par le gène ntd de *Lactobacillus amylovorus*.

7. Polypeptide isolé selon la revendication 1  
5 caractérisé en ce que le polypeptide de SEQ ID N°12 est codé par la N-désoxyribosyltransférase codé par le gène ntd de *Lactobacillus acidophilus*.

8. Polypeptide isolé caractérisé en ce qu'il  
10 comprend un polypeptide choisi parmi :

a) un polypeptide de séquence SEQ ID N°2, SEQ ID N°4, SEQ ID N°6, SEQ ID N°8, SEQ ID N°10, SEQ ID N°12.

b) un polypeptide variant de polypeptide de séquences d'acides aminés défini en a) ;

15 c) un polypeptide homologue au polypeptide défini en a) ou b) et comportant au moins 80 % d'identité avec ledit polypeptide de a) ;

d) un fragment d'au moins 15 acides aminés consécutifs d'un polypeptide défini en a) ;

20 e) un fragment biologiquement actif d'un polypeptide défini en a), b) ou c).

9. Polypeptide selon les revendications 1 à 8 caractérisé en ce qu'il permet de satisfaire l'exigence  
25 en guanine de la souche PAK6 déposée à la CNCM le 2 mai 2001 sous le N° I-2664.

10. Polynucléotide purifié ou isolé caractérisé en ce qu'il code pour un polypeptide selon les  
30 revendications 1 à 9.

11. Polynucléotide selon la revendication 10 de séquence SEQ ID N°1, SEQ ID N°3, SEQ ID N°5, SEQ ID N°7, SEQ ID N°9, SEQ ID N°11, SEQ ID N°13.

5 12. Polynucléotide isolé caractérisé en ce qu'il comprend un polynucléotide choisi parmi :

a) SEQ ID N°1, SEQ ID N°3, SEQ ID N°5, SEQ ID N°7, SEQ ID N°9, SEQ ID N°11, SEQ ID N°13.

b) la séquence d'un fragment d'au moins 15  
10 nucléotides consécutifs de la séquence SEQ ID N°1, SEQ ID N°3, SEQ ID N°5, SEQ ID N°7, SEQ ID N°9, SEQ ID N°11, SEQ ID N°13 ;

c) une séquence nucléique présentant un pourcentage d'identité d'au moins 70 %, après alignement  
15 optimal avec une séquence définie en a) ou b) ;

d) la séquence complémentaire ou la séquence d'ARN correspondant à une séquence telle que définie en a), b) ou c).

20 13. Polynucléotide selon les revendications 10 à 12 caractérisé en ce que son expression dans les souches PAK6 permet de satisfaire à l'exigence en guanine de la dite souche.

25 14. Utilisation d'un polynucléotide selon la revendication 12 en tant qu'amorce pour l'amplification ou la polymérisation de séquences nucléiques de N-désoxyribosyltransférases.

30 15. Utilisation d'un polynucléotide selon les revendications 10 à 13 en tant que sonde pour la

détection de séquences nucléiques de N-désoxyribosyltransférases.

16. Vecteur recombinant de clonage et/ou  
5 d'expression comprenant un polynucléotide selon l'une des revendications 10 à 13 ou exprimant un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 9.
17. Vecteur recombinant appelé pLH2 comprenant le  
10 polynucléotide SEQ ID N°1 tel que présent dans la souche bactérienne déposée à la CNCM le 30 mai 2001 sous le N°I-2676.
18. Vecteur recombinant appelé pLH4 comprenant le  
15 polynucléotide SEQ ID N°3 tel que présent dans la souche bactérienne déposée à la CNCM le 30 mai 2001 sous le N°I-2677.
19. Vecteur recombinant appelé pLF6 comprenant le  
20 polynucléotide SEQ ID N°5 tel que présent dans la souche bactérienne déposée à la CNCM le 30 mai 2001 sous le N°I-2678.
20. Vecteur recombinant appelé pLA comprenant le  
25 polynucléotide SEQ ID N°20 tel que présent dans la souche bactérienne déposée à la CNCM le 21 juin 2001 sous le N°I-2689.
21. Cellule hôte, caractérisée en ce qu'elle est  
30 transformée par un vecteur selon les revendications 16 à 20.



22. Bactérie transformée par le vecteur pLH2 comprenant le polynucléotide SEQ ID N°1 telle que déposée à la CNCM le 30 mai 2001 sous le N°I-2676.

5 23. Bactérie transformée par le vecteur pLH4 comprenant le polynucléotide SEQ ID N°3 telle que déposée à la CNCM le 30 mai 2001 sous le N°I-2677.

10 24. Bactérie transformée par le vecteur pLF6 comprenant le polynucléotide SEQ ID N°5 telle que déposée à la CNCM le 30 mai 2001 sous le N°I-2678.

15 25. Bactérie transformée par le vecteur pLA comprenant le polynucléotide SEQ ID N°9 telle que déposée à la CNCM le 21 juin 2001 sous le N°I-2689.

26. Organisme métazoaire animal ou végétal, excepté l'homme, caractérisé en ce qu'il comprend une cellule selon la revendication 21.

20

27. Procédé de préparation d'un polypeptide recombinant caractérisé en ce que l'on cultive une cellule hôte selon la revendication 21 ou une bactérie selon les revendications 22 à 25 dans des conditions  
25 permettant l'expression et éventuellement la sécrétion dudit polypeptide recombinant et que l'on récupère ledit polypeptide recombinant.

28. Polypeptide recombinant susceptible d'être  
30 obtenu par un procédé selon la revendication 27.

29. Anticorps monoclonal ou polyclonal et ses fragments caractérisés en ce qu'il lie sélectivement un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 9 ou 28.

5 30. Procédé de synthèse enzymatique *in vitro* ou *in vivo* de désoxyribonucléotides caractérisé en ce qu'il comprend au moins une étape réactionnelle catalysée par une N-désoxyribosyltransférase selon l'une quelconque des revendications 1 à 9.

10

31. Procédé selon la revendication 30 caractérisé en ce que la dite N-désoxyribosyltransférase catalyse l'échange d'une première nucléobase présente dans un désoxyribonucléoside par une seconde nucléobase.

15

32. Procédé selon la revendication 31 caractérisé en ce que ladite seconde nucléobase est sélectionnée dans le groupe composé des purines liées par N9, des pyrimidines liées par N1, des azines liées par N1, des imidazoles  
20 liées par N1, lesdites secondes nucléobases pouvant porter des substitutions des hydrogènes aux positions non liées.

33. Procédé selon la revendication 32 caractérisé en  
25 ce que la dite seconde nucléobase est sélectionnée dans le groupe composé de la 6-méthyl purine, 2-amino-6-méthylmercaptapurine, 6-diméthylaminopurine, 5-azacytidine, 2,6-dichloropurine, 6-chloroguanine, 6-chloropurine, 6-aza-thymine, 5-fluoro-uracile, éthyl-4-  
30 amino-5-imidazole carboxylate, imidazole-4-carboxamide et 1,2,4-triazole-3-carboxamide.

34. Procédé selon la revendication 31 caractérisé en ce que la dite première nucléobase est sélectionnée dans le groupe composé de l'adénine, la guanine, la thymine, l'uracile et l'hypoxanthine.

5

35. Procédé *in vivo* selon les revendications 31 à 34 caractérisé en ce qu'il comprend en outre l'étape d'introduire dans la cellule hôte la première nucléobase présente dans un désoxyribonucléoside.

10

36. Procédé *in vivo* selon les revendications 31 à 34 caractérisé en ce qu'il comprend en outre l'étape d'introduire dans la cellule hôte la seconde nucléobase présente dans un désoxyribonucléoside.

15

37. Procédé *in vivo* selon les revendications 31 à 34 caractérisé en ce qu'il comprend en outre l'étape d'introduire dans la cellule hôte la première nucléobase présente dans un désoxyribonucléoside et la seconde nucléobase de manière simultanée et/ou décalée dans le temps.

25

30

## LISTE DE SEQUENCES

<110> Institut PASTEUR  
Institut National de la Recherche Agronomique INRA

<120> N-desoxyribosyl transferases de Lactobacillus,  
sequences nucleotidiques correspondantes et leurs  
applications

<130> D19532

<160> 16

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 477

<212> ADN

<213> Lactobacillus helveticus NTD

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(477)

<400> 1

|   |     |
|---|-----|
| atg aac aag aaa aag act tta tat ttt ggt gcc ggt tgg ttt aat gaa | 48  |
| Met Asn Lys Lys Lys Thr Leu Tyr Phe Gly Ala Gly Trp Phe Asn Glu |     |
| 1 5 10 15   |     |
| aag caa aac aaa gct tac aaa gaa gca atg gca gct tta aaa gaa aat | 96  |
| Lys Gln Asn Lys Ala Tyr Lys Glu Ala Met Ala Ala Leu Lys Glu Asn |     |
| 20 25 30  |     |
| cca aca gtt gat tta gaa aat agt tat gtg ccc ctt gaa aac caa tac | 144 |
| Pro Thr Val Asp Leu Glu Asn Ser Tyr Val Pro Leu Glu Asn Gln Tyr |     |
| 35 40 45  |     |
| aag ggt att cgc att gat gaa cat cca gaa tac ttg cac aac att gaa | 192 |
| Lys Gly Ile Arg Ile Asp Glu His Pro Glu Tyr Leu His Asn Ile Glu |     |
| 50 55 60  |     |
| tgg gct tct gca acc tac cac aat gat tta gta gga att aag act tct | 240 |
| Trp Ala Ser Ala Thr Tyr His Asn Asp Leu Val Gly Ile Lys Thr Ser |     |
| 65 70 75 80   |     |
| gat gtc atg ctt ggc gta tat ttg cca gaa gaa gaa gac gtc ggc tta | 288 |
| Asp Val Met Leu Gly Val Tyr Leu Pro Glu Glu Glu Asp Val Gly Leu |     |
| 85 90 95  |     |
| ggc atg gaa ctg ggc tac gca tta tct caa gga aaa tat att tta ttg | 336 |
| Gly Met Glu Leu Gly Tyr Ala Leu Ser Gln Gly Lys Tyr Ile Leu Leu |     |
| 100 105 110   |     |
| gtt atc cca gat gaa gat tac ggc aag cca atc aac tta atg agc tgg | 384 |
| Val Ile Pro Asp Glu Asp Tyr Gly Lys Pro Ile Asn Leu Met Ser Trp |     |
| 115 120 125   |     |
| ggc gtt tgt gac aat gcc atc aag atc agt gaa tta aaa gac ttc gac | 432 |
| Gly Val Cys Asp Asn Ala Ile Lys Ile Ser Glu Leu Lys Asp Phe Asp |     |
| 130 135 140   |     |

ttt aac aag cct cgc tac aat ttc tac gac gga gct gta tat taa 477  
 Phe Asn Lys Pro Arg Tyr Asn Phe Tyr Asp Gly Ala Val Tyr  
 145 150 155

<210> 2  
 <211> 158  
 <212> PRT  
 <213> Lactobacillus helveticus NTD

<400> 2  
 Met Asn Lys Lys Lys Thr Leu Tyr Phe Gly Ala Gly Trp Phe Asn Glu  
 1 5 10 15  
 Lys Gln Asn Lys Ala Tyr Lys Glu Ala Met Ala Ala Leu Lys Glu Asn  
 20 25 30  
 Pro Thr Val Asp Leu Glu Asn Ser Tyr Val Pro Leu Glu Asn Gln Tyr  
 35 40 45  
 Lys Gly Ile Arg Ile Asp Glu His Pro Glu Tyr Leu His Asn Ile Glu  
 50 55 60  
 Trp Ala Ser Ala Thr Tyr His Asn Asp Leu Val Gly Ile Lys Thr Ser  
 65 70 75 80  
 Asp Val Met Leu Gly Val Tyr Leu Pro Glu Glu Glu Asp Val Gly Leu  
 85 90 95  
 Gly Met Glu Leu Gly Tyr Ala Leu Ser Gln Gly Lys Tyr Ile Leu Leu  
 100 105 110  
 Val Ile Pro Asp Glu Asp Tyr Gly Lys Pro Ile Asn Leu Met Ser Trp  
 115 120 125  
 Gly Val Cys Asp Asn Ala Ile Lys Ile Ser Glu Leu Lys Asp Phe Asp  
 130 135 140  
 Phe Asn Lys Pro Arg Tyr Asn Phe Tyr Asp Gly Ala Val Tyr  
 145 150 155

<210> 3  
 <211> 504  
 <212> ADN  
 <213> Lactobacillus helveticus PTD

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(504)

<400> 3  
 atg aaa gca gta gtt cca aca gga aaa att tat tta ggc tca cca ttt 48  
 Met Lys Ala Val Val Pro Thr Gly Lys Ile Tyr Leu Gly Ser Pro Phe  
 1 5 10 15  
 tac agc gat gct caa aga gaa aga gca gct aag gca aaa gag ttg tta 96  
 Tyr Ser Asp Ala Gln Arg Glu Arg Ala Ala Lys Ala Lys Glu Leu Leu  
 20 25 30

gca aaa aat cta agc atc gcg cac gtc ttc ttc ccc ttt gat gat ggt 144  
 Ala Lys Asn Leu Ser Ile Ala His Val Phe Phe Pro Phe Asp Asp Gly  
 35 40 45  
 ttc acc gat cct gat gaa aag aat cct gaa att ggc ggc atc aga agc 192  
 Phe Thr Asp Pro Asp Glu Lys Asn Pro Glu Ile Gly Gly Ile Arg Ser  
 50 55 60  
 atg gtt tgg cgg gat gca act tac caa aat gat tta act ggt att tcg 240  
 Met Val Trp Arg Asp Ala Thr Tyr Gln Asn Asp Leu Thr Gly Ile Ser  
 65 70 75 80  
 aat gcc act tgt ggc gtc ttc tta tat gat atg gat caa tta gat gac 288  
 Asn Ala Thr Cys Gly Val Phe Leu Tyr Asp Met Asp Gln Leu Asp Asp  
 85 90 95  
 ggc tct gcc ttt gaa att ggc ttc atg cgt gcg atg cat aag ccg gtg 336  
 Gly Ser Ala Phe Glu Ile Gly Phe Met Arg Ala Met His Lys Pro Val  
 100 105 110  
 atc ttg gtg cca ttc act gag cat ccc gaa aaa gaa aag aaa atg aac 384  
 Ile Leu Val Pro Phe Thr Glu His Pro Glu Lys Glu Lys Lys Met Asn  
 115 120 125  
 ctg atg atc gca caa ggc gta acc acc atc att gat ggc aat act gaa 432  
 Leu Met Ile Ala Gln Gly Val Thr Thr Ile Ile Asp Gly Asn Thr Glu  
 130 135 140  
 ttt gaa aaa cta gct gat tat aac ttc aac gaa tgt cct ttt aat cca 480  
 Phe Glu Lys Leu Ala Asp Tyr Asn Phe Asn Glu Cys Pro Phe Asn Pro  
 145 150 155 160  
 gtt cgc ggt tac ggt atc tat taa 504  
 Val Arg Gly Tyr Gly Ile Tyr  
 165

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 167

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Lactobacillus helveticus PTD

&lt;400&gt; 4

Met Lys Ala Val Val Pro Thr Gly Lys Ile Tyr Leu Gly Ser Pro Phe  
 1 5 10 15  
 Tyr Ser Asp Ala Gln Arg Glu Arg Ala Ala Lys Ala Lys Glu Leu Leu  
 20 25 30  
 Ala Lys Asn Leu Ser Ile Ala His Val Phe Phe Pro Phe Asp Asp Gly  
 35 40 45  
 Phe Thr Asp Pro Asp Glu Lys Asn Pro Glu Ile Gly Gly Ile Arg Ser  
 50 55 60  
 Met Val Trp Arg Asp Ala Thr Tyr Gln Asn Asp Leu Thr Gly Ile Ser  
 65 70 75 80  
 Asn Ala Thr Cys Gly Val Phe Leu Tyr Asp Met Asp Gln Leu Asp Asp  
 85 90 95

Gly Ser Ala Phe Glu Ile Gly Phe Met Arg Ala Met His Lys Pro Val  
 100 105 110  
 Ile Leu Val Pro Phe Thr Glu His Pro Glu Lys Glu Lys Lys Met Asn  
 115 120 125  
 Leu Met Ile Ala Gln Gly Val Thr Thr Ile Ile Asp Gly Asn Thr Glu  
 130 135 140  
 Phe Glu Lys Leu Ala Asp Tyr Asn Phe Asn Glu Cys Pro Phe Asn Pro  
 145 150 155 160  
 Val Arg Gly Tyr Gly Ile Tyr  
 165

<210> 5  
 <211> 516  
 <212> ADN  
 <213> Lactobacillus fermentum NTD

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(504)

<400> 5  
 ttg aaa aat acc gac cca gtt gct aac act aaa att tac ctg gct acc 48  
 Leu Lys Asn Thr Asp Pro Val Ala Asn Thr Lys Ile Tyr Leu Ala Thr  
 1 5 10 15  
 agc ttc ttc aac gaa gaa caa cgt gcc cgc atc cct caa gct cta gcc 96  
 Ser Phe Phe Asn Glu Glu Gln Arg Ala Arg Ile Pro Gln Ala Leu Ala  
 20 25 30  
 caa cta gaa gcc aac ccg act gtc ggc gtt gtt cac cag cca ttc gat 144  
 Gln Leu Glu Ala Asn Pro Thr Val Gly Val Val His Gln Pro Phe Asp  
 35 40 45  
 ttc caa tat aaa gat gca cgc gta gac tcc gat cct gcc ggc gtc ttt 192  
 Phe Gln Tyr Lys Asp Ala Arg Val Asp Ser Asp Pro Ala Gly Val Phe  
 50 55 60  
 ggc agc ctc gaa tgg caa att gcc act tac aat aac gac ctc aac gcg 240  
 Gly Ser Leu Glu Trp Gln Ile Ala Thr Tyr Asn Asn Asp Leu Asn Ala  
 65 70 75 80  
 gta gga act tcc gat gtc tgc gtt gct tta tac gat atg gac caa att 288  
 Val Gly Thr Ser Asp Val Cys Val Ala Leu Tyr Asp Met Asp Gln Ile  
 85 90 95  
 gac gaa gga att tgt atg gaa atc ggc atg ttc gtc gcc ctc cat aaa 336  
 Asp Glu Gly Ile Cys Met Glu Ile Gly Met Phe Val Ala Leu His Lys  
 100 105 110  
 cct atc gtt tta cta cct ttt act aag aaa gat aag tct gct tat gaa 384  
 Pro Ile Val Leu Leu Pro Phe Thr Lys Lys Asp Lys Ser Ala Tyr Glu  
 115 120 125  
 gct aac cta atg cta gca cgg ggt gta act acc tgg ttg gaa cct aat 432  
 Ala Asn Leu Met Leu Ala Arg Gly Val Thr Thr Trp Leu Glu Pro Asn

130                                      135                                      140  
 gac ttt agt ccc tta aaa gac ttt aac ttt aac cac cca atg gct caa 480  
 Asp Phe Ser Pro Leu Lys Asp Phe Asn Phe Asn His Pro Met Ala Gln  
 145                                      150                                      155                                      160  
 cct ttc cca cca ttc aag gtt ttc taactaacct aa 516  
 Pro Phe Pro Pro Phe Lys Val Phe  
 165

<210> 6  
 <211> 168  
 <212> PRT  
 <213> Lactobacillus fermentum NTD

<400> 6  
 Leu Lys Asn Thr Asp Pro Val Ala Asn Thr Lys Ile Tyr Leu Ala Thr  
 1                                      5                                      10                                      15  
 Ser Phe Phe Asn Glu Glu Gln Arg Ala Arg Ile Pro Gln Ala Leu Ala  
 20                                      25                                      30  
 Gln Leu Glu Ala Asn Pro Thr Val Gly Val Val His Gln Pro Phe Asp  
 35                                      40                                      45  
 Phe Gln Tyr Lys Asp Ala Arg Val Asp Ser Asp Pro Ala Gly Val Phe  
 50                                      55                                      60  
 Gly Ser Leu Glu Trp Gln Ile Ala Thr Tyr Asn Asn Asp Leu Asn Ala  
 65                                      70                                      75                                      80  
 Val Gly Thr Ser Asp Val Cys Val Ala Leu Tyr Asp Met Asp Gln Ile  
 85                                      90                                      95  
 Asp Glu Gly Ile Cys Met Glu Ile Gly Met Phe Val Ala Leu His Lys  
 100                                      105                                      110  
 Pro Ile Val Leu Leu Pro Phe Thr Lys Lys Asp Lys Ser Ala Tyr Glu  
 115                                      120                                      125  
 Ala Asn Leu Met Leu Ala Arg Gly Val Thr Thr Trp Leu Glu Pro Asn  
 130                                      135                                      140  
 Asp Phe Ser Pro Leu Lys Asp Phe Asn Phe Asn His Pro Met Ala Gln  
 145                                      150                                      155                                      160  
 Pro Phe Pro Pro Phe Lys Val Phe  
 165

<210> 7  
 <211> 255  
 <212> ADN  
 <213> Lactobacillus crispatus NTD

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (3) .. (254)



&lt;400&gt; 7

ac aac cag tac aag ggt atc cgc gtt gat gaa cac cct gaa tac ttg 47  
 Asn Gln Tyr Lys Gly Ile Arg Val Asp Glu His Pro Glu Tyr Leu  
 1 5 10 15

cac gac att gaa tgg gca tca gct acc tac cat aac gac tta gta ggg 95  
 His Asp Ile Glu Trp Ala Ser Ala Thr Tyr His Asn Asp Leu Val Gly  
 20 25 30

att aag tcc agc gac atc atg ctt ggc gtt tac ttg cct gaa gaa gaa 143  
 Ile Lys Ser Ser Asp Ile Met Leu Gly Val Tyr Leu Pro Glu Glu Glu  
 35 40 45

gat gtt ggt ctg gga atg gaa ctt ggc tat gcc ctt tca aaa ggc aag 191  
 Asp Val Gly Leu Gly Met Glu Leu Gly Tyr Ala Leu Ser Lys Gly Lys  
 50 55 60

tac atc ttg ttg gta att cct gat gaa gat tac ggt aag cca atc aac 239  
 Tyr Ile Leu Leu Val Ile Pro Asp Glu Asp Tyr Gly Lys Pro Ile Asn  
 65 70 75

tta atg agc tgg ggc a 255  
 Leu Met Ser Trp Gly  
 80

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 84

&lt;212&gt; PRT

<213> *Lactobacillus crispatus* NTD

&lt;400&gt; 8

Asn Gln Tyr Lys Gly Ile Arg Val Asp Glu His Pro Glu Tyr Leu His  
 1 5 10 15

Asp Ile Glu Trp Ala Ser Ala Thr Tyr His Asn Asp Leu Val Gly Ile  
 20 25 30

Lys Ser Ser Asp Ile Met Leu Gly Val Tyr Leu Pro Glu Glu Glu Asp  
 35 40 45

Val Gly Leu Gly Met Glu Leu Gly Tyr Ala Leu Ser Lys Gly Lys Tyr  
 50 55 60

Ile Leu Leu Val Ile Pro Asp Glu Asp Tyr Gly Lys Pro Ile Asn Leu  
 65 70 75 80

Met Ser Trp Gly

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 399

&lt;212&gt; ADN

<213> *Lactobacillus amylovorus* NTD

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(399)

<400> 9  
 atg gaa gct tta aag aag aac cct act gtt gac tta gaa aac agt tac 48  
 Met Glu Ala Leu Lys Lys Asn Pro Thr Val Asp Leu Glu Asn Ser Tyr  
 1 5 10 15  
 gtc cca ctt gat aac caa tac aaa ggc atc cgc gtt gat gaa cac cca 96  
 Val Pro Leu Asp Asn Gln Tyr Lys Gly Ile Arg Val Asp Glu His Pro  
 20 25 30  
 gaa tat tta cac gac att gaa tgg gca tca tct acc tac cac aat gac 144  
 Glu Tyr Leu His Asp Ile Glu Trp Ala Ser Ser Thr Tyr His Asn Asp  
 35 40 45  
 tta gtt ggt att aag tct tca gac gta atg ctc ggt gtt tat tta cct 192  
 Leu Val Gly Ile Lys Ser Ser Asp Val Met Leu Gly Val Tyr Leu Pro  
 50 55 60  
 gaa gaa gaa gat gtt ggc ctt ggg atg gaa ctt ggc tac gca ttg tct 240  
 Glu Glu Glu Asp Val Gly Leu Gly Met Glu Leu Gly Tyr Ala Leu Ser  
 65 70 75 80  
 caa ggt aaa tac atc ttg ctt gtc atc cct gac gaa gac tat ggt aag 288  
 Gln Gly Lys Tyr Ile Leu Leu Val Ile Pro Asp Glu Asp Tyr Gly Lys  
 85 90 95  
 cca atc aac ttg atg agc tgg ggc gtt tgc gac aac gta atc aag atc 336  
 Pro Ile Asn Leu Met Ser Trp Gly Val Cys Asp Asn Val Ile Lys Ile  
 100 105 110  
 agc gaa ttg aaa gac ttc gac ttt aac aga cct cgc ttc aac ttt tac 384  
 Ser Glu Leu Lys Asp Phe Asp Phe Asn Arg Pro Arg Phe Asn Phe Tyr  
 115 120 125  
 gat ggt gct gtc tat 399  
 Asp Gly Ala Val Tyr  
 130

<210> 10  
 <211> 133  
 <212> PRT  
 <213> Lactobacillus amylovorus NTD

<400> 10  
 Met Glu Ala Leu Lys Lys Asn Pro Thr Val Asp Leu Glu Asn Ser Tyr  
 1 5 10 15  
 Val Pro Leu Asp Asn Gln Tyr Lys Gly Ile Arg Val Asp Glu His Pro  
 20 25 30  
 Glu Tyr Leu His Asp Ile Glu Trp Ala Ser Ser Thr Tyr His Asn Asp  
 35 40 45  
 Leu Val Gly Ile Lys Ser Ser Asp Val Met Leu Gly Val Tyr Leu Pro  
 50 55 60  
 Glu Glu Glu Asp Val Gly Leu Gly Met Glu Leu Gly Tyr Ala Leu Ser  
 65 70 75 80  
 Gln Gly Lys Tyr Ile Leu Leu Val Ile Pro Asp Glu Asp Tyr Gly Lys  
 85 90 95

Pro Ile Asn Leu Met Ser Trp Gly Val Cys Asp Asn Val Ile Lys Ile  
 100 105 110

Ser Glu Leu Lys Asp Phe Asp Phe Asn Arg Pro Arg Phe Asn Phe Tyr  
 115 120 125

Asp Gly Ala Val Tyr  
 130

<210> 11

<211> 480

<212> ADN

<213> Lactobacillus acidophilus NTD

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(480)

<400> 11

atg atg gca aaa aca aaa act tta tat ttc ggc gct ggt tgg ttt aat 48  
 Met Met Ala Lys Thr Lys Thr Leu Tyr Phe Gly Ala Gly Trp Phe Asn  
 1 5 10 15

gaa aag caa aat aag gct tat aaa gca gct atg gaa gct tta aaa caa 96  
 Glu Lys Gln Asn Lys Ala Tyr Lys Ala Ala Met Glu Ala Leu Lys Gln  
 20 25 30

aac cct act gtt gat ttg gaa aat agt tat gtt cca ctt gaa aat caa 144  
 Asn Pro Thr Val Asp Leu Glu Asn Ser Tyr Val Pro Leu Glu Asn Gln  
 35 40 45

tat aaa gat att cgt gtt gat gaa cat cct gaa tac tta cac gac att 192  
 Tyr Lys Asp Ile Arg Val Asp Glu His Pro Glu Tyr Leu His Asp Ile  
 50 55 60

gaa tgg gca tct gct act tat cac aac gac tta att ggt atc aaa tct 240  
 Glu Trp Ala Ser Ala Thr Tyr His Asn Asp Leu Ile Gly Ile Lys Ser  
 65 70 75 80

tca gat att atg tta ggg gtt tac tta cct gaa gaa gaa gat gtt ggt 288  
 Ser Asp Ile Met Leu Gly Val Tyr Leu Pro Glu Glu Glu Asp Val Gly  
 85 90 95

ctt ggt atg gaa ctt ggc tac gca tta tca caa ggc aaa tat atc tta 336  
 Leu Gly Met Glu Leu Gly Tyr Ala Leu Ser Gln Gly Lys Tyr Ile Leu  
 100 105 110

ctc gtt att cct gac gaa gat tat ggc aag cct atc aac ttg atg agt 384  
 Leu Val Ile Pro Asp Glu Asp Tyr Gly Lys Pro Ile Asn Leu Met Ser  
 115 120 125

tgg ggt gta tgt gat aac gct att aag atc agc gaa ttg aag gac ttc 432  
 Trp Gly Val Cys Asp Asn Ala Ile Lys Ile Ser Glu Leu Lys Asp Phe  
 130 135 140

gac ttc aat aag cca cgc ttt aac ttc tat gat ggc gct gta tat taa 480  
 Asp Phe Asn Lys Pro Arg Phe Asn Phe Tyr Asp Gly Ala Val Tyr  
 145 150 155 160

<210> 12  
 <211> 159  
 <212> PRT  
 <213> Lactobacillus acidophilus NTD

<400> 12  
 Met Met Ala Lys Thr Lys Thr Leu Tyr Phe Gly Ala Gly Trp Phe Asn  
           1                          5                          10                          15  
 Glu Lys Gln Asn Lys Ala Tyr Lys Ala Ala Met Glu Ala Leu Lys Gln  
                           20                          25                          30  
 Asn Pro Thr Val Asp Leu Glu Asn Ser Tyr Val Pro Leu Glu Asn Gln  
                           35                          40                          45  
 Tyr Lys Asp Ile Arg Val Asp Glu His Pro Glu Tyr Leu His Asp Ile  
           50                          55                          60  
 Glu Trp Ala Ser Ala Thr Tyr His Asn Asp Leu Ile Gly Ile Lys Ser  
           65                          70                          75                          80  
 Ser Asp Ile Met Leu Gly Val Tyr Leu Pro Glu Glu Glu Asp Val Gly  
                           85                          90                          95  
 Leu Gly Met Glu Leu Gly Tyr Ala Leu Ser Gln Gly Lys Tyr Ile Leu  
                           100                          105                          110  
 Leu Val Ile Pro Asp Glu Asp Tyr Gly Lys Pro Ile Asn Leu Met Ser  
                           115                          120                          125  
 Trp Gly Val Cys Asp Asn Ala Ile Lys Ile Ser Glu Leu Lys Asp Phe  
           130                          135                          140  
 Asp Phe Asn Lys Pro Arg Phe Asn Phe Tyr Asp Gly Ala Val Tyr  
           145                          150                          155

<210> 13  
 <211> 795  
 <212> ADN  
 <213> Lactobacillus helveticus NTD

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (140)..(616)

<220>  
 <223> n signifie n'importe quel nucléotide : a, g, c ou  
           t/u

<400> 13  
 aaaaaaattt tcagtatttag tcattgaatt ttaccttcca ttatggaatt actattttta 60  
 gcgtaagtta acaagacggt tttttcaatc gaaaatatgt taaagttaat tcgtcagcaa 120  
 tttttatggg ganaaaatt atg aac aag aaa aag act tta tat ttt ggt gcc 172  
                           Met Asn Lys Lys Lys Thr Leu Tyr Phe Gly Ala  
                           1                          5                          10

ggt tgg ttt aat gaa aag caa aac aaa gct tac aaa gaa gca atg gca 220  
 Gly Trp Phe Asn Glu Lys Gln Asn Lys Ala Tyr Lys Glu Ala Met Ala  
                   15                                  20                                  25

gct tta aaa gaa aat cca aca gtt gat tta gaa aat agt tat gtg ccc 268  
 Ala Leu Lys Glu Asn Pro Thr Val Asp Leu Glu Asn Ser Tyr Val Pro  
                   30                                  35                                  40

ctt gaa aac caa tac aag ggt att cgc att gat gaa cat cca gaa tac 316  
 Leu Glu Asn Gln Tyr Lys Gly Ile Arg Ile Asp Glu His Pro Glu Tyr  
                   45                                  50                                  55

ttg cac aac att gaa tgg gct tct gca acc tac cac aat gat tta gta 364  
 Leu His Asn Ile Glu Trp Ala Ser Ala Thr Tyr His Asn Asp Leu Val  
                   60                                  65                                  70                                  75

gga att aag act tct gat gtc atg ctt ggc gta tat ttg cca gaa gaa 412  
 Gly Ile Lys Thr Ser Asp Val Met Leu Gly Val Tyr Leu Pro Glu Glu  
                                   80                                  85                                  90

gaa gac gtc ggc tta ggc atg gaa ctg ggc tac gca tta tct caa gga 460  
 Glu Asp Val Gly Leu Gly Met Glu Leu Gly Tyr Ala Leu Ser Gln Gly  
                                   95                                  100                                  105

aaa tat att tta ttg gtt atc cca gat gaa gat tac ggc aag cca atc 508  
 Lys Tyr Ile Leu Leu Val Ile Pro Asp Glu Asp Tyr Gly Lys Pro Ile  
                   110                                  115                                  120

aac tta atg agc tgg ggc gtt tgt gac aat gcc atc aag atc agt gaa 556  
 Asn Leu Met Ser Trp Gly Val Cys Asp Asn Ala Ile Lys Ile Ser Glu  
                   125                                  130                                  135

tta aaa gac ttc gac ttt aac aag cct cgc tac aat ttc tac gac gga 604  
 Leu Lys Asp Phe Asp Phe Asn Lys Pro Arg Tyr Asn Phe Tyr Asp Gly  
                   140                                  145                                  150                                  155

gct gta tat taa aaaataagca aactaaatga cctatcgctt aaaaattgcg 656  
 Ala Val Tyr

ataggtcatt ttttaatat attctgtcatg tataaaatct ttcttaataa atatactcca 716

agtgattttc caaaaaaatt attattctat acccacttca tatggaagtc cgagtcactt 776

atgtaaatca tatatcact 795

<210> 14  
 <211> 158  
 <212> PRT  
 <213> Lactobacillus helveticus NTD

<400> 14  
 Met Asn Lys Lys Lys Thr Leu Tyr Phe Gly Ala Gly Trp Phe Asn Glu  
           1                  5                                  10                                  15

Lys Gln Asn Lys Ala Tyr Lys Glu Ala Met Ala Ala Leu Lys Glu Asn  
                   20                                  25                                  30

Pro Thr Val Asp Leu Glu Asn Ser Tyr Val Pro Leu Glu Asn Gln Tyr  
           35                                  40                                  45

Lys Gly Ile Arg Ile Asp Glu His Pro Glu Tyr Leu His Asn Ile Glu  
     50                    55                    60  
 Trp Ala Ser Ala Thr Tyr His Asn Asp Leu Val Gly Ile Lys Thr Ser  
     65                    70                    75                    80  
 Asp Val Met Leu Gly Val Tyr Leu Pro Glu Glu Glu Asp Val Gly Leu  
                     85                    90                    95  
 Gly Met Glu Leu Gly Tyr Ala Leu Ser Gln Gly Lys Tyr Ile Leu Leu  
             100                    105                    110  
 Val Ile Pro Asp Glu Asp Tyr Gly Lys Pro Ile Asn Leu Met Ser Trp  
             115                    120                    125  
 Gly Val Cys Asp Asn Ala Ile Lys Ile Ser Glu Leu Lys Asp Phe Asp  
     130                    135                    140  
 Phe Asn Lys Pro Arg Tyr Asn Phe Tyr Asp Gly Ala Val Tyr  
     145                    150                    155

<210> 15  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Lactobacillus leichmannii NTD1

<400> 15  
 agacgatcta cttcgggtg

18

<210> 16  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Lactobacillus leichmannii NTD2

<400> 16  
 acggcacctt cgtagaag

18

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
27 mars 2003 (27.03.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 03/025163 A3**

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> : C12N 9/10,  
15/54, 15/63, 1/21, 15/74, C07K 16/12, C12P 19/38

(74) Mandataire : SANTARELLI; BP 237, 14, avenue de la  
Grande Armée, F-75822 Paris Cedex 17 (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR02/03120

(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,  
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,  
MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,  
SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,  
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) Date de dépôt international :  
12 septembre 2002 (12.09.2002)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
01/11911 14 septembre 2001 (14.09.2001) FR

(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,  
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet  
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet  
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,  
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), brevet  
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,  
MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Déposants (*pour tous les États désignés sauf US*) : IN-  
STITUT PASTEUR [FR/FR]; 28, rue du Docteur Roux,  
F-75015 Paris (FR). INSTITUT NATIONAL DE LA  
RECHERCHE AGRONOMIQUE [FR/FR]; 145, rue de  
l'Université, F-75007 Paris (FR).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale.

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : KAMIN-  
SKI, Pierre-Alexandre [FR/FR]; 4, rue Bailly, F-75003  
Paris (FR). TAILLIEZ, Patrick [FR/FR]; 22bis, rue  
Fénelon - Le Val d'Albion, F-91400 Saclay (FR). MAR-  
LIERE, Philippe [FR/FR]; 2, Allée Saint-Martin, F-91450  
Étiolles (FR). QUENEE, Pascal [FR/FR]; 1, allée du Bois  
de Nogent, F-78310 Maurepas (FR). COTAYA, Rachel  
[FR/FR]; 3, rue Jeanne d'Arc, F-75013 Paris (FR).

(88) Date de publication du rapport de recherche  
internationale: 18 décembre 2003

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.

(54) Title: LACTOBACILLUS N-DEOXYRIBOSYL TRANSFERASES, CORRESPONDING NUCLEOTIDE SEQUENCES  
AND THEIR USES

(54) Titre: N-DESOXYRIBOSYLTRANSFERASES DE LACTOBACILLIES, SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES CORRESPON-  
DANTES ET LEURS APPLICATIONS

(57) Abstract: The invention concerns novel polypeptides and their fragments, isolated from Lactobacillus, having at least a N-de-  
oxyribosyl transferase activity, the polynucleotides encoding said polypeptides, cloning and/or expression vectors including said  
polynucleotides, cells transformed by said vectors and specific antibodies directed against said polypeptides. The invention also  
concerns a method for enzymatic synthesis of deoxyribonucleosides.

(57) Abrégé : La présente invention concerne de nouveaux polypeptides et leurs fragments, isolés de Lactobacillus, ayant au moins  
une activité N-désoxyribosyltransférase, les polynucléotides, les polynucléotides codant et/ou d'expression incluant lesdits vecteurs  
et les anticorps spécifiques dirigés contre lesdits polypeptides. L'invention concerne également un procédé de synthèse enzymatique  
de désoxyribonucléosides.

WO 03/025163 A3

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Internat<sup>l</sup> Application No  
 PCT/FR 02/03120

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

 IPC 7 C12N9/10 C12N15/54 C12N15/63 C12N1/21 C12N15/74  
 C07K16/12 C12P19/38

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, PAJ, EPO-Internal, WPI Data, EMBL

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| X          | DANZIN C ET AL: "DEOXY RIBOSYL TRANSFER<br>CATALYSIS WITH TRANS-N DEOXY RIBOSYLASE<br>KINETIC STUDY OF PURINE PYRIMIDINE TO<br>PYRIMIDINE PURINE TRANS-N DEOXY<br>RIBOSYLASE"<br>EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY,<br>vol. 62, no. 2, 1976, pages 365-372,<br>XP008005626<br>ISSN: 0014-2956<br>the whole document<br>---<br>-/-- | 1                     |



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*G\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 May 2003

Date of mailing of the international search report

Name and mailing address of the ISA

 European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mateo Rosell, A.M.



## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No.        |
|------------|--|------------------------------|
| X          | HOLGUIN J ET AL:<br>"TRANS-N-DEOXYRIBOSYLASE. PURIFICATION BY<br>AFFINITY CHROMATOGRAPHY AND<br>CHARACTERIZATION"<br>CHEMICAL ABSTRACTS + INDEXES, AMERICAN<br>CHEMICAL SOCIETY. COLUMBUS, US,<br>vol. 83, no. 7,<br>18 August 1975 (1975-08-18), page 199<br>XP002044164<br>ISSN: 0009-2258<br>abstract | 1                            |
| X          | OKUYAMA KIYOSHI ET AL: "Molecular cloning<br>and expression of the nucleoside<br>deoxyribosyltransferase-II gene from<br>Lactobacillus helveticus."<br>BIOSCIENCE BIOTECHNOLOGY AND BIOCHEMISTRY,<br>vol. 64, no. 10, October 2000 (2000-10),<br>pages 2243-2245, XP001074051<br>ISSN: 0916-8451         | 1,12                         |
| A          | the whole document   | 1,2,<br>8-17,21,<br>22,26-37 |
| X          | WO 01 14566 A (IHLENFELDT HANS GEORG<br>;PHARMA WALDHOF GMBH & CO KG (DE); TISCHER<br>W) 1 March 2001 (2001-03-01)   | 8,12                         |
| A          | SEQ.ID.N.13 & 14<br>page 9, line 10 -page 10, line 3   | 1,2,<br>8-17,21,<br>22,26-37 |
| A          | US 6 087 132 A (VASILOIU ROXANA)<br>11 July 2000 (2000-07-11)  | 1,2,<br>8-17,21,<br>22,26-37 |
| X          | the whole document   |                              |
| X          | DATABASE EMBL 'Online!<br>1 May 2000 (2000-05-01)<br>Database accession no. Q9R5V5<br>XP002240249<br>Nucleoside 2-DEOXYRIBOSYLTRANSFERASE<br>(EC 2.4.2.6).<br>Escherichia coli.<br>abstract  | 8                            |
|            | ---  |                              |
|            | -/--   |                              |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 02/03120

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No.        |
|------------|--|------------------------------|
| P,X        | KAMINSKI PIERRE ALEXANDRE: "Functional cloning, heterologous expression, and purification of two different N-deoxyribosyltransferases from <i>Lactobacillus helveticus</i> ."<br>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 277, no. 17, 26 April 2002 (2002-04-26), pages 14400-14407, XP002206140<br>April 26, 2002<br>ISSN: 0021-9258<br>the whole document<br>--- | 1,2,<br>8-17,21,<br>22,26-37 |
| P,X        | DATABASE EMBL 'Online!<br>17 June 2002 (2002-06-17)<br>Database accession no. AAG66170<br>XP002206141<br>Nucleoside deoxyribosyltransferase-II abstract<br>& JP 2002 051781 A<br>19 February 2002 (2002-02-19)<br>---  | 1,2,<br>8-17,21,<br>22,26-37 |
| P,X        | ---  | 8,12                         |
| P,X        | DATABASE EMBL 'Online!<br>19 June 2002 (2002-06-19)<br>Database accession no. AB076265<br>XP002240250<br><i>Lactobacillus helveticus</i> genes for nucleoside deoxyribosyltransferase-I, putative adenosine deaminase, hypothetical proteins, partial and complete cds.<br>abstract<br>-----   | 11,12                        |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 02/03120

| Patent document<br>cited in search report |   | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|---|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 0114566                                | A | 01-03-2001          | AU 6571700 A               | 19-03-2001          |
|   |   |                     | CA 2382462 A1              | 01-03-2001          |
|   |   |                     | WO 0114566 A2              | 01-03-2001          |
|   |   |                     | EP 1206551 A2              | 22-05-2002          |
|   |   |                     | HU 0203049 A2              | 28-12-2002          |
|   |   |                     | JP 2003507071 T            | 25-02-2003          |
| US 6087132                                | A | 11-07-2000          | DE 4020529 A1              | 21-03-1991          |
|   |   |                     | AT 161286 T                | 15-01-1998          |
|   |   |                     | AU 6279390 A               | 18-04-1991          |
|   |   |                     | WO 9104322 A1              | 04-04-1991          |
|   |   |                     | DE 59010784 D1             | 29-01-1998          |
|   |   |                     | DK 491739 T3               | 24-08-1998          |
|   |   |                     | EP 0491739 A1              | 01-07-1992          |
|   |   |                     | EP 0816508 A1              | 07-01-1998          |
|   |   |                     | ES 2110418 T3              | 16-02-1998          |
|   |   |                     | JP 3032289 B2              | 10-04-2000          |
|   |   |                     | JP 7500481 T               | 19-01-1995          |
| JP 2002051781                             | A | 19-02-2002          | NONE                       |                     |

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No  
PCT/FR 02/03120

|  |  |  |
|--|--|--|
| <b>A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE</b><br>CIB 7    C12N9/10    C12N15/54    C12N15/63    C12N1/21    C12N15/74<br>C07K16/12    C12P19/38  |  |  |
| Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB  |  |  |
| <b>B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b><br>Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)<br>CIB 7    C12N   |  |  |
| Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche  |  |  |
| Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)<br>BIOSIS, PAJ, EPO-Internal, WPI Data, EMBL  |  |  |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b>  |  |  |
| Catégorie *  | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents   | no. des revendications visées  |
| X  | DANZIN C ET AL: "DEOXY RIBOSYL TRANSFER CATALYSIS WITH TRANS-N DEOXY RIBOSYLASE KINETIC STUDY OF PURINE PYRIMIDINE TO PYRIMIDINE PURINE TRANS-N DEOXY RIBOSYLASE"<br>EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY,<br>vol. 62, no. 2, 1976, pages 365-372,<br>XP008005626<br>ISSN: 0014-2956<br>le document en entier<br><div style="text-align: center;">---<br/>-/--</div> | 1  |
| <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <span><input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents</span> <span><input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe</span> </div>  |  |  |
| <div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>* Catégories spéciales de documents cités:</p> <p>*A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>*E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>*L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>*O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>*P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>*T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>*X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>*Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>*Z* document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div> |  |  |
| Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée<br><br><div style="text-align: center;">13 mai 2003</div>  |  | Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale<br><br><div style="text-align: center;">26 MAI 2003</div> |
| Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale<br>Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,<br>Fax: (+31-70) 340-3016  |  | Fonctionnaire autorisé<br><br><div style="text-align: center;">Mateo Rosell, A.M.</div>                                    |

| C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS |  |                               |
|---|--|-------------------------------|
| Catégorie                                       | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents   | no. des revendications visées |
| X   | HOLGUIN J ET AL:<br>"TRANS-N-DEOXYRIBOSYLASE. PURIFICATION BY<br>AFFINITY CHROMATOGRAPHY AND<br>CHARACTERIZATION"<br>CHEMICAL ABSTRACTS + INDEXES, AMERICAN<br>CHEMICAL SOCIETY. COLUMBUS, US,<br>vol. 83, no. 7, 18 août 1975 (1975-08-18),<br>page 199 XP002044164.<br>ISSN: 0009-2258<br>abrégé | 1                             |
| X   | OKUYAMA KIYOSHI ET AL: "Molecular cloning<br>and expression of the nucleoside<br>deoxyribosyltransferase-II gene from<br>Lactobacillus helveticus."<br>BIOSCIENCE BIOTECHNOLOGY AND BIOCHEMISTRY,<br>vol. 64, no. 10, octobre 2000 (2000-10),<br>pages 2243-2245, XP001074051<br>ISSN: 0916-8451   | 1,12                          |
| A   | le document en entier  | 1,2,<br>8-17,21,<br>22,26-37  |
| X   | WO 01 14566 A (IHLENFELDT HANS GEORG<br>;PHARMA WALDHOF GMBH & CO KG (DE); TISCHER<br>W) 1 mars 2001 (2001-03-01)  | 8,12                          |
| A   | SEQ.ID.N.13 & 14<br>page 9, ligne 10 -page 10, ligne 3   | 1,2,<br>8-17,21,<br>22,26-37  |
| A   | US 6 087 132 A (VASILOIU ROXANA)<br>11 juillet 2000 (2000-07-11)<br><br>le document en entier  | 1,2,<br>8-17,21,<br>22,26-37  |
| X   | DATABASE EMBL 'en ligne!<br>1 mai 2000 (2000-05-01)<br>Database accession no. Q9R5V5<br>XP002240249<br>Nucleoside 2-DEOXYRIBOSYLTRANSFERASE<br>(EC 2.4.2.6).<br>Escherichia coli.<br>abrégé  | 8                             |
|   | ---<br>-/--  |                               |

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 02/03120

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents   | no. des revendications visées |
|-----------|--|-------------------------------|
| P,X       | KAMINSKI PIERRE ALEXANDRE: "Functional cloning, heterologous expression, and purification of two different N-deoxyribosyltransferases from Lactobacillus helveticus."<br>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 277, no. 17,<br>26 avril 2002 (2002-04-26), pages 14400-14407, XP002206140<br>April 26, 2002<br>ISSN: 0021-9258<br>le document en entier<br>--- | 1,2,<br>8-17,21,<br>22,26-37  |
| P,X       | DATABASE EMBL 'en ligne!<br>17 juin 2002 (2002-06-17)<br>Database accession no. AAG66170<br>XP002206141<br>Nucleoside deoxyribosyltransferase-II abrégé<br>& JP 2002 051781 A<br>19 février 2002 (2002-02-19)<br>---   | 1,2,<br>8-17,21,<br>22,26-37  |
| P,X       | ---  | 8,12                          |
| P,X       | DATABASE EMBL 'en ligne!<br>19 juin 2002 (2002-06-19)<br>Database accession no. AB076265<br>XP002240250<br>Lactobacillus helveticus genes for nucleoside deoxyribosyltransferase-I, putative adenosine deaminase, hypothetical proteins, partial and complete cds.<br>abrégé<br>-----  | 11,12                         |

## SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/ 210

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs (groupes d') inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. revendications: 1,8-16,21,26-37 partiellement et, 2,17,  
22 complètement

Polypeptide isolé ou purifié de *Lactobacillus* ayant au moins une activité N-déoxyribosyltransférase de séquences d'acides aminés choisi parmi les séquences SEQ.ID.N.2;  
polynucléotides choisis parmi les séquences SEQ.ID.N.1, vecteur, amorces, sondes, bactérie transformée par le vecteur contenant un des polynucléotides choisis parmi les séquences SEQ.ID.N.1, anticorps monoclonal, procédé de synthèse in vitro ou in vivo de désoxyribonucléotides catalisé par une déoxyribosyltransférase choisi parmi les séquences SEQ.ID.N.2.

2. revendications: 1,8-16,21,26-37 partiellement et, 3,18,  
23 complètement

Polypeptide isolé ou purifié de *Lactobacillus* ayant au moins une activité N-déoxyribosyltransférase de séquences d'acides aminés choisi parmi les séquences SEQ.ID.N.4;  
polynucléotides choisis parmi les séquences SEQ.ID.N.3, vecteur, amorces, sondes, bactérie transformée par le vecteur contenant un des polynucléotides choisis parmi les séquences SEQ.ID.N.3, anticorps monoclonal, procédé de synthèse in vitro ou in vivo de désoxyribonucléotides catalisé par une déoxyribosyltransférase choisi parmi les séquences SEQ.ID.N.4.

3. revendications: 1,8-16,21,26-37 partiellement et, 4,19,  
24 complètement

Polypeptide isolé ou purifié de *Lactobacillus* ayant au moins une activité N-déoxyribosyltransférase de séquences d'acides aminés choisi parmi les séquences SEQ.ID.N.6;  
polynucléotides choisis parmi les séquences SEQ.ID.N.5, vecteur, amorces, sondes, bactérie transformée par le vecteur contenant un des polynucléotides choisis parmi les séquences SEQ.ID.N.5, anticorps monoclonal, procédé de synthèse in vitro ou in vivo de désoxyribonucléotides catalisé par une déoxyribosyltransférase choisi parmi les séquences SEQ.ID.N.6.

4. revendications: 1,8-16,21,26-37 partiellement et, 5 complètement

Polypeptide isolé ou purifié de *Lactobacillus* ayant au moins

## SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/ 210

une activité N-déoxyribosyltransférase de séquences d'acides aminés choisi parmi les séquences SEQ.ID.N.8;  
polynucléotides choisis parmi les séquences SEQ.ID.N.7, vecteur, amorces, sondes, bacterie transformé par le vecteur contenant un des polynucléotides choisis parmi les séquences SEQ.ID.N.7, anticorps monoclonal, procédé de synthèse in vitro ou in vivo de désoxyribonucléotides catalisé par une déoxyribosyltransferase choisi parmi les séquences SEQ.ID.N.8.

## 5. revendications: 1,8-16,21,26-37 partiellement et 6 complètement

Polypeptide isolé ou purifié de Lactobacillus ayant au moins une activité N-déoxyribosyltransférase de séquences d'acides aminés choisi parmi les séquences SEQ.ID.N.10;  
polynucléotides choisis parmi les séquences SEQ.ID.N.9, vecteur, amorces, sondes, bacterie transformé par le vecteur contenant un des polynucléotides choisis parmi les séquences SEQ.ID.N.9, anticorps monoclonal, procédé de synthèse in vitro ou in vivo de désoxyribonucléotides catalisé par une déoxyribosyltransferase choisi parmi les séquences SEQ.ID.N.10.

## 6. revendications: 1,8-16,21,26-37 partiellement et, 7,20, 25 complètement

Polypeptide isolé ou purifié de Lactobacillus ayant au moins une activité N-déoxyribosyltransférase de séquences d'acides aminés choisi parmi les séquences SEQ.ID.N.12;  
polynucléotides choisis parmi les séquences SEQ.ID.N.11, vecteur, amorces, sondes, bacterie transformé par le vecteur contenant un des polynucléotides choisis parmi les séquences SEQ.ID.N.11, anticorps monoclonal, procédé de synthèse in vitro ou in vivo de désoxyribonucléotides catalisé par une déoxyribosyltransferase choisi parmi les séquences SEQ.ID.N.12.



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. internationale n°  
PCT/FR 02/03120

## Cadre I Observations – lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☐ Les revendications n<sup>os</sup> se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
2. ☐ Les revendications n<sup>os</sup> se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
3. ☐ Les revendications n<sup>os</sup> sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

## Cadre II Observations – lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

voir feuille supplémentaire

1. ☒ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n<sup>os</sup>
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n<sup>os</sup>

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☒ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux numéros de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR 02/03120

| Document brevet cité<br>au rapport de recherche |   | Date de<br>publication | Membre(s) de la<br>famille de brevet(s) | Date de<br>publication |
|---|---|------------------------|---|------------------------|
| WO 0114566                                      | A | 01-03-2001             | AU 6571700 A                            | 19-03-2001             |
|   |   |                        | CA 2382462 A1                           | 01-03-2001             |
|   |   |                        | WO 0114566 A2                           | 01-03-2001             |
|   |   |                        | EP 1206551 A2                           | 22-05-2002             |
|   |   |                        | HU 0203049 A2                           | 28-12-2002             |
|   |   |                        | JP 2003507071 T                         | 25-02-2003             |
| US 6087132                                      | A | 11-07-2000             | DE 4020529 A1                           | 21-03-1991             |
|   |   |                        | AT 161286 T                             | 15-01-1998             |
|   |   |                        | AU 6279390 A                            | 18-04-1991             |
|   |   |                        | WO 9104322 A1                           | 04-04-1991             |
|   |   |                        | DE 59010784 D1                          | 29-01-1998             |
|   |   |                        | DK 491739 T3                            | 24-08-1998             |
|   |   |                        | EP 0491739 A1                           | 01-07-1992             |
|   |   |                        | EP 0816508 A1                           | 07-01-1998             |
|   |   |                        | ES 2110418 T3                           | 16-02-1998             |
|   |   |                        | JP 3032289 B2                           | 10-04-2000             |
|   |   |                        | JP 7500481 T                            | 19-01-1995             |
| JP 2002051781                                   | A | 19-02-2002             | AUCUN                                   |                        |